

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه آزاد اسلامی

واحد علوم و تحقیقات

رساله دکتری رشته بیولوژی دریا (Ph.D)

عنوان

بررسی هورمونی و هیستولوژی هورمون گرلین روی تخمدان ماهی بنی *Barbus sharpeyi*

به منظور بررسی رسیدگی جنسی و زادآوری تخم و لارو

استادان راهنما

دکتر شهلا جمیلی

دکتر نعیم عرفانی مجد (آلبوغیش)

استادان مشاور

دکتر محمد رضا فاطمی

دکتر غلامحسین وثوقی

نگارنده

حدیده معبودی

سال تحصیلی ۱۳۸۹-۱۳۹۰



این مختصر مجال سپاس گذاری را آغاز می کنم با نام خدا که سر فصل همه فصل هاست

سپاس بیکران بر مادر پر مهرم و رحمت بر روح پدر بزرگووارم؛ سپاس بر همسر خستگی ناپذیرم که همیشه و در همه اوقات همراه و هم نفس تلاشهایم است.

تشکر و سپاس بی پایان از: خانم دکتر شهلا جمیلی که با کمک ها و راهنماییهای دلسوزانه و خواهرانه، در تمام مراحل پایان نامه مرا یاری نمودند؛ آقای دکتر نعیم عرفانی مجد (آلبوغبیش) که از راهنماییهای ارزنده ایشان در عملیات بافت شناسی و نگارش پایان نامه نهایت استفاده را نمودم؛

آقای دکتر محمد رضا فاطمی که ضمن بهره گیری از محضر علمی ایشان، سمت استاد مشاور این پایان نامه را قبول زحمت نمودند؛ آقای دکتر غلامحسین وثوقی که افتخار شاگردی ایشان را داشته و استاد مشاور پایان نامه هستند.

از استادان محترم آقای دکتر مهدی شمسایی داور داخلی و آقایان دکتر عباس متین فر و دکتر محمود رامین داوران خارجی پایان نامه تشکر می کنم که با توجهات و بررسی های ایشان، نکات مثبت و ارزنده ای دریافت نمودم.

از خانم دکتر پرگل قوام مصطفوی مدیر گروه بیولوژی دریا و همچنین استاد ناظر پایان نامه و از آقای دکتر علی ماشینچیان مرادی که ضمن اینکه افتخار شاگردی ایشان را داشته ام، سمت استاد ناظر پایان نامه را دارند تشکر می نمایم.

سپاس بر آقای دکتر جاوید ریاست محترم دانشکده علوم و فنون دریایی که دلسوزانه در تمام مراحل تحصیل یآوری شایسته برای من بودند.

و تشکر می کنم از: آقای مهندس سواری سرپرست مرکز تکثیر ماهیان بومی دشت سوسنگرد که در تهیه ماهی های مولد و انجام عملیات تزریق و تکثیر نمونه ها بسیار همکاری نمودند؛ آقای ایرانشاهی کارشناس محترم آزمایشگاه بافت شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز که با همفکری های ارزنده شان مرا در انجام عملیات بافت شناسی یاری نمودند؛ آقای ملکی کارشناس آزمایشگاه پاتوبیولوژی رشت که در اندازه گیری هورمون همکاری نمودند و آقایان احرابی و موسوی و خانم محمدی کارشناسان آموزش دانشکده و خانم سعیدی مدیر پژوهش دانشکده، که در طول دوران تحصیل یاریگرم بودند.

و در نهایت از دوستان دوره دکتری که هر کدام به نحوی مرا در انجام مراحل پایان نامه همراهی نمودند سپاس گزارم.

تقدیم به

روح پدرم که زندگی پرتلاش و صادقانه را به من آموخت،

مادر پرمهرم که مأمّن خستگیهایم و یاریگر راه علم آموزیم است،

همسر پرتلاشم که همراه صبور و خستگی ناپذیر عرصه های سخت
زندگیم است ،

یگانه دخترم که لبخندهایش انگیزه بخش راهم است،

خواهرم و دوستانم که ترنم محبت و غمخوارم در زندگی هستند.

فهرست مطالب

چکیده..... ۱

۱- فصل اول:

کلیات..... ۳

۱-۱- گرلین..... ۶

۱-۱-۱- اکتشاف گرلین..... ۶

۱-۱-۲- ساختمان شیمیایی..... ۶

۱-۱-۳- انتشار گرلین در بدن جانداران..... ۸

۱-۱-۴- عملکردهای فیزیولوژیک شناخته شده گرلین..... ۸

۱-۱-۵- عملکرد تولید مثلی گرلین..... ۱۵

۱-۲- فیزیولوژی تولید مثل ماده..... ۱۸

۱-۲-۱- هورمونهای گنادوتروپینی هیپوفیز..... ۱۹

۱-۲-۲- هورمونهای استروئیدی تخمدان..... ۲۴

۱-۲-۳- تغییرات هورمونی چرخه تولید مثلی ماده..... ۲۵

۱-۳- مورفولوژی و ساختار بافتی تخمدان ماهی..... ۲۸

۱-۳-۱- اووژنز..... ۲۸

۱-۳-۲- تشخیص میزان رسیدگی غدد تناسلی کپور ماهی ها..... ۳۰

۱-۳-۳- ویتلوژنز..... ۳۱

۱-۳-۴- اووسیت های تحلیل رفته..... ۳۲

۱-۳-۵- بلوغ اووسیت..... ۳۳

۱-۳-۶- تخمک گذاری..... ۳۳

۱-۴- تکثیر مصنوعی..... ۳۵

۱-۴-۱- علل نیازمندی به تکثیر مصنوعی..... ۳۶

۱-۴-۲- تکنولوژی تکثیر مصنوعی ماهی..... ۳۶

۱-۴-۳- اختلالات تولید مثلی ماهیان پرورشی..... ۴۳

۱-۴-۴- کاربرد هورمون های جدید در تکثیر مصنوعی..... ۴۴

۴۵	۵-۱ رده بندی و خصوصیات نژادی بنی.....
۴۵	۱-۵-۱ ماهی بنی.....
۵۰	۶-۱ مطالعات انجام شده.....
۵۲	فصل دوم: مواد و روشها.....
۵۲	۱-۲ مواد مورد استفاده.....
۵۲	۱-۱-۲ ماهیان مورد آزمایش.....
۵۲	۲-۱-۲ مواد مصرفی تزریق و تکثیر ماهیان.....
۵۲	۳-۱-۲ مواد مصرفی آماده سازی نمونه های بافتی.....
۵۲	۲-۲ وسایل و دستگاههای مورد استفاده.....
۵۲	۱-۲-۲ وسایل و دستگاههای تکثیر ماهیان.....
۵۳	۲-۲-۲ وسایل و دستگاههای خونگیری.....
۵۴	۳-۲-۲ دستگاههای آماده سازی نمونه های بافتی.....
۵۴	۳-۲ روش کار.....
۵۴	۱-۳-۲ نمونه برداری.....
۵۵	۲-۳-۲ عملیات پلاک گذاری و تزریق.....
۵۷	۳-۳-۲ جداسازی ماهیان برای مطالعه.....
۵۷	۴-۳-۲ مطالعه هورمونی.....
۵۸	۵-۳-۲ مطالعه بافتی.....
۶۸	۶-۳-۲ مطالعه همآوری و بازماندگی تخمک و لارو.....
۷۲	۷-۳-۲ مطالعه آماری.....
	فصل سوم:
۷۲	نتایج.....
۷۳	۱-۳ نتایج هورمونی.....
۷۸	۲-۳ نتایج بافتی.....
۷۸	۱-۲-۳ نتایج مطالعات ماکروسکوپی.....
۸۱	۲-۲-۳ نتایج مطالعات میکروسکوپی.....

۹۶	۳-۳ نتایج بازماندگی تخم و لارو.....
۹۶	۳-۳-۱ همآوری.....
۹۸	۳-۳-۲ درصد لقاح.....
۹۹	۳-۳-۳ درصد هچ (تفریخ).....
۱۰۰	۳-۳-۴ درصد بازماندگی لارو.....
۱۰۱	۳-۴ مقایسه نتایج حاصل از دو تکرار.....
۱۰۱	فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری.....
۱۰۶	۴-۱ تأثیر هورمون گرلین بر سطح سرمی GTH-II.....
۱۰۷	۴-۱-۱ بررسی دوزهای گرلین مورد استفاده برای تیمار نمونه ها.....
۱۰۸	۴-۱-۲ مقایسه اثر گرلین و هیپوفیز بر سطح سرمی GTH-II.....
۱۰۸	۴-۱-۳ مطالعه اثر زمانهای مختلف خونگیری بر میزان GTH-II.....
۱۰۹	۴-۲ تأثیر گرلین بر بافت تخمدان.....
۱۰۹	۴-۲-۱ تحلیل مشاهدات ماکروسکوپی.....
۱۱۰	۴-۲-۲ تحلیل مشاهدات میکروسکوپی.....
۱۱۵	۴-۳ بررسی اثرات بر همآوری تخمدان، لقاح، تفریخ و بازماندگی لاروها.....
۱۱۸	۴-۴ بررسی دو تکرار تیمارها.....
۱۱۹	۴-۵ نتیجه گیری.....
۱۲۱	۴-۶ پیشنهادات.....
۱۲۲	منابع.....
۱۳۰	Abstract.....

فهرست جداول

جدول ۱-۱	دستورالعمل تزریق ماهی بنی.....	۳۷
جدول ۱-۲	اثر دما بر رسیدگی جنسی.....	۳۸
جدول ۱-۳	برده بندی ماهی بنی <i>Barbus sharpeyi</i>	۴۷
جدول ۱-۲	مقیاس عدسی مدرج چشمی بر اساس اسلاید کالیبره میکرومتر.....	۶۸
جدول ۱-۳	میزان هورمون (IU) در هر یک از تیمارها در چهار زمان نمونه برداری.....	۷۳
جدول ۲-۳	مقادیر P value در مقایسه دبدو چهار تیمار از نظر هورمونی توسط آزمون LSD.....	۷۵
جدول ۳-۳	مقادیر P value از نظر زمانهای مورد مطالعه توسط آزمون t زوج.....	۷۷
جدول ۴-۳	میانگین وزن بدن، وزن تخمدان و GSI ماهی بنی در چهار تیمار مورد مطالعه.....	۸۰
جدول ۵-۳	مقادیر P value تیمارهای مورد مقایسه از نظر وزن بدن، وزن و حجم تخمدان و GSI.....	۸۱
جدول ۶-۳	نتایج میکرومتری- میانگین درصد فولیکولهای بالغ و نابالغ در پنج تیمار مورد مطالعه.....	۹۰
جدول ۷-۳	نتایج میکرومتری – میانگین قطر فولیکول (mm) در پنج تیمار مورد مطالعه.....	۹۰
جدول ۸-۳	مقادیر P value تیمارها از نظر فولیکولهای بالغ و نابالغ توسط آزمون LSD.....	۹۱
جدول ۹-۳	مقادیر P value معنی دار تیمارها از نظر قطر فولیکول توسط آزمون LSD.....	۹۵
جدول ۱۰-۳	همآوری کاری و مقایسه آماری تیمارهای گرلین و هیپوفیز.....	۹۷
جدول ۱۱-۳	درصد لقاح و مقایسه آماری در تیمارهای گرلین و هیپوفیز.....	۹۸
جدول ۱۲-۳	درصد تفریح و مقایسه آماری در تیمارهای گرلین و هیپوفیز.....	۹۹
جدول ۱۳-۳	درصد بازماندگی لارو و مقایسه آماری در تیمارهای گرلین و هیپوفیز.....	۱۰۰
جدول ۱۴-۳	مقایسه نتایج هورمونی دو تکرار تیمارهای مورد مطالعه با استفاده از آزمون t.....	۱۰۱
جدول ۱۵-۳	مقایسه میانگین فولیکولهای نابالغ تیمارها در دو تکرار با استفاده از آزمون t.....	۱۰۲
جدول ۱۶-۳	مقایسه میانگین فولیکولهای بالغ تیمارها در دو تکرار با استفاده از آزمون t.....	۱۰۲
جدول ۱۷-۳	مقایسه میانگین قطر فولیکول تیمارها در دو تکرار با استفاده از آزمون t.....	۱۰۳
جدول ۱۸-۳	مقایسه میانگین همآوری تیمارها در دو تکرار با استفاده از آزمون t.....	۱۰۳
جدول ۱۹-۳	مقایسه میانگین درصد لقاح تیمارها در دو تکرار با استفاده از آزمون t.....	۱۰۴
جدول ۲۰-۳	مقایسه میانگین درصد هچ تیمارها در دو تکرار با استفاده از آزمون t.....	۱۰۴

جدول ۲۱-۳ مقایسه میانگین درصد بازماندگی لارو تیمارها در دو تکرار با استفاده از آزمون t...۱۰۴

فهرست اشکال

- شکل ۱-۱ دیاگرام شماتیک ساختار اینترون-اگزون ژن گرلین در تیلارپا..... ۷
- شکل ۲-۱ ردیف آمینو اسیدی پپتید گرلین در نمونه هایی از ماهیان استخوانی..... ۸
- شکل ۳-۱ دیاگرام مسیرهای احتمالی گرلین از مغز و معده..... ۱۲
- شکل ۴-۱ دیاگرام شماتیک عملکردهای احتمالی گرلین در رشد، تولید مثل و غذا خوردن..... ۱۵
- شکل ۵-۱ تأثیر گرلین بر محور HPG..... ۱۸
- شکل ۶-۱ بنی مراحل رشد و بلوغ اووسیت..... ۳۵
- شکل ۷-۱ تغییر حجم تخم شستشو یافته..... ۳۹
- شکل ۸-۱ انواع انکوباتورهای قیفی شکل..... ۴۱
- شکل ۹-۱ خصوصیات مورفولوژیک ماهی..... ۴۶
- شکل ۱-۲ انکوباتورهای ویس و زوک..... ۵۳
- شکل ۲-۲ استخر سرامیکی و وان پلاستیکی..... ۵۳
- شکل ۳-۲ پلاکهای آلومینیومی..... ۵۳
- شکل ۴-۲ ترازوی دیجیتالی..... ۵۳
- شکل ۵-۲ ظروف هماتوکریت..... ۵۴
- شکل ۶-۲ دستگاه سانتریفوژ..... ۵۴
- شکل ۷-۲ دستگاه هیستوکینت..... ۵۴
- شکل ۸-۲ دستگاه میکروتوم..... ۵۴
- شکل ۹-۲ عملیات صید از استخرهای خاکی..... ۵۵
- شکل ۱۰-۲ انتقال ماهی زنده به کارگاه..... ۵۵
- شکل ۱۱-۲ پلاک گذاری ماهیان..... ۵۶
- شکل ۱۲-۲ سانتریفوژ نمونه های خون..... ۵۷
- شکل ۱۳-۲ عکس و مدل دستگاه گاما کانتر..... ۵۸
- شکل ۱۴-۲ بررسی شکل و رنگ تخمدان ماهی بنی..... ۵۸
- شکل ۱۵-۲ قالب گیری نمونه ها..... ۶۰
- شکل ۱۶-۲ بلوک پارافینی اصلاح شده..... ۶۰

- شکل ۲-۱۷ برش های سریال حاصل از برش گیری..... ۶۱
- شکل ۲-۱۸ ظروف مراحل رنگامیزی هماتوکسیلین- ائوزین..... ۶۲
- شکل ۲-۱۹ ظروف مراحل رنگامیزی پریودیک اسید شیف..... ۶۴
- شکل ۲-۲۰ دستگاه فوتو میکروسکوپ..... ۶۷
- شکل ۲-۲۱ تخم کشی..... ۶۸
- شکل ۲-۲۲ نمونه ای از تخمک های استحصالی..... ۶۹
- شکل ۲-۲۳ لقاح مصنوعی..... ۷۰
- شکل ۲-۲۴ شستشو تخم ها..... ۷۰
- شکل ۲-۲۵ انتقال تخم ها به انکوباتور ویس..... ۷۱
- شکل ۲-۲۶ انتقال لاروها به انکوباتور زوک..... ۷۱
- نمودار ۳-۱ میزان هورمون GTH-II در هر یک از چهار تیمار a-d..... ۷۴
- نمودار ۳-۲ مقایسه چهار تیمار از نظر میزان هورمون GTH-II در زمانهای مختلف..... ۷۶
- نمودار ۳-۳ نمودار پالسی GTH-II در زمانهای مختلف خونگیری..... ۷۷
- شکل ۳-۱ موقعیت تخمدان ها اطراف کیسه شنا..... ۷۸
- نمودار ۳-۴ میانگین وزن کل بدن در تیمارهای مورد مطالعه..... ۷۹
- نمودار ۳-۵ میانگین وزن تخمدان در تیمارهای مورد مطالعه..... ۷۹
- نمودار ۳-۶ میانگین حجم تخمدان در تیمارهای مورد مطالعه..... ۷۹
- نمودار ۳-۷ شاخص GSI در تیمارهای مورد مطالعه..... ۸۰
- تصویر ۳-۲ تیغه تخمک را تخمدان ماهی بنی (H&E \times 3.2)..... ۸۲
- تصویر ۳-۳ تخمدان ناهمزمان (تخمک ها با اندازه های متفاوت) ماهی بنی (H&E \times 3.2)..... ۸۲
- تصویر ۳-۴ ساختار بافتی اووسیت در مرحله کروماتین نوکلئولوس (Cn) (H&E \times 10)..... ۸۳
- تصویر ۳-۵ ساختار بافتی اووسیت در مرحله پری نوکلئولوس (Pn) (H&E \times 10)..... ۸۳
- تصویر ۳-۶ ساختار بافتی اووسیت ماهی بنی در مرحله وزیکول چربی (H&E \times 10)..... ۸۴
- تصویر ۳-۷ ساختار بافتی اووسیت ماهی بنی در مرحله آخر وزیکول چربی (H&E \times 10)..... ۸۴
- تصویر ۳-۸ ساختار بافتی اووسیت ماهی بنی در مرحله زرده سازی اولیه (Py) (H&E \times 10)..... ۸۵
- تصویر ۳-۹ ساختار بافتی اووسیت ماهی بنی در مرحله زرده سازی اولیه (PAS \times 10)..... ۸۵

- تصویر ۱۰-۳ ساختار بافتی اووسیت در مرحله زرده سازی ثانویه (Sy) (H&E \times 10)..... ۸۶
- تصویر ۱۱-۳ ساختار بافتی اووسیت ماهی بنی در مرحله زرده سازی ثانویه (PAS \times 40) ۸۶
- تصویر ۱۲-۳ ساختار بافتی اووسیت ماهی در مرحله زرده سازی ثالثیه (Ty) (H&E \times 3.2) ۸۷
- تصویر ۱۳-۳ ساختار بافتی اووسیت ماهی بنی در مرحله زرده سازی ثالثیه (PAS \times 20)..... ۸۷
- تصویر ۱۴-۳ Zona Radiata کامل اطراف یک فولیکول در تخمدان ماهی بنی (H&E \times 10)..... ۸۸
- تصویر ۱۵-۳ Zona Radiata کامل اطراف یک فولیکول در تخمدان ماهی بنی (H&E \times 20)..... ۸۸
- تصویر ۱۶-۳ مهاجرت هسته در فولیکول بالغ ماهی بنی (H&E \times 10)..... ۸۹
- تصویر ۱۷-۳ اووسیت آتروفه ماهی بنی (H&E \times 10)..... ۸۹
- نمودار ۸-۳ مقایسه بلوغ اووسیت بر اساس درصد فولیکولهای بالغ و نابالغ در تیمارهای مختلف..... ۹۱
- نمودار ۹-۳ مقایسه دوبرو تیمارهای مورد بررسی از نظر قطر فولیکول a-g..... ۹۲
- نمودار ۱۰-۳ مقایسه پنج تیمار مورد مطالعه از نظر میانگین قطر فولیکول..... ۹۵
- نمودار ۱۱-۳ همآوری کاری تیمار یک گرلین و تیمار هیپوفیز..... ۹۷
- نمودار ۱۲-۳ درصد لقاح در تیمار یک گرلین (۱۰۰ng) و تیمار هیپوفیز..... ۹۸
- نمودار ۱۳-۳ درصد تفریح تخم ها در تیمار یک گرلین (۱۰۰ng) و تیمار هیپوفیز..... ۹۹
- نمودار ۱۴-۳ درصد بازماندگی لارو در تیمار یک گرلین (۱۰۰ng) و تیمار هیپوفیز..... ۱۰۰

چکیده

ماهی بنی (*Barbus sharpeyi*) از ماهیان با ارزش شیلاتی می باشد و هر ساله تکثیر مصنوعی آن توسط اداره کل شیلات خوزستان در مرکز تکثیر ماهیان بومی دشت سوسنگرد انجام می شود، سالهاست که برای تلقیح مصنوعی ماهیان مذکور از غده هیپوفیز استفاده می شود ولی ماهیان مولد ماده پس از ۲-۳ سال قدرت باروری خود را از دست می دهند؛ به همین لحاظ هورمون جدید گرلین در این تحقیق بررسی و اثرات آنها مقایسه شد. هدف تحقیق حاضر بررسی اثرات هورمون در سه بخش هورمونی، بافتی و بازماندگی تخم ها و مقایسه تیمارها با یکدیگر به منظور مطالعه میزان اثربخشی گرلین بر رسیدگی جنسی و مراحل بعد از تخم کشی می باشد.

گرلین پپتیدی است که باعث افزایش میزان هورمون های هیپوفیزی از جمله GTH-II در ماهیان، دوزیستان، پرندگان و پستانداران می شود، لذا تأثیر آن بر روند رسیدگی جنسی گونه ذکر شده مطالعه شد. هورمون پپتیدی گرلین به صورت پودر کریستاله از شرکت AnaSpec کشور کانادا خریداری شد.

۵۶ ماهی مولد با دو تکرار در بخش هورمونی به چهار و در بخش بافتی و بازماندگی به پنج تیمار تقسیم شدند، دو تیمار به عنوان sham (شم صفر و شم ۲۴ ساعته) فقط سرم فیزیولوژی به صورت درون صفاقی دریافت نمودند، به گروه سوم گرلین با دوز ۱۰۰ نانوگرم در گرم وزن بدن و به گروه چهارم گرلین با دوز ۱۵۰ نانوگرم در گرم وزن بدن به صورت درون صفاقی تزریق شد و گروه پنجم هیپوفیز با دوز ۴ میلی گرم در گرم وزن بدن دریافت نمودند.

میزان هورمون GTH-II سرم نمونه ها، توسط تکنیک رادیو ایمنو اسی اندازه گیری شد و پس از اندازه گیری های ماکروسکوپی تخمدان، مقداری از بافت تخمدان در محلول بوئن ۱۵٪ فیکس شد و پس از گذراندن مراحل مختلف، برشهای میکروسکوپی به ضخامت ۵-۶ میکرومتر تهیه و به دو روش هماتوکسیلین ائوزین و پریودیک اسید شیف رنگامیزی گردیدند. مطالعات میکروسکوپی در دو بخش هیستولوژی و میکرومتری توسط میکروسکوپ نوری انجام شد.

از آن دسته از مولدینی که رسیده شدند تخم کشی انجام شد و تخمک های استحصالی شمارش شده و همآوری کاری تیمارها محاسبه شد، پس از لقاح تخمک ها با اسپرم های تلقیح شده تخم ها شستشو داده شده و انکوباسیون می شوند و پس از ۲۴ ساعت درصد لقاح و پس از ۷۲ ساعت درصد تفریح تخم ها در تیمارها محاسبه و مقایسه شد و در زمان مناسب لاروها به انکوباتور بزرگتر (زوک) منتقل شدند و پس از حدود ۶ روز درصد بازماندگی آنها محاسبه و مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج هورمونی نشان می دهد هر دو تیمار گرلین و هیپوفیز سبب افزایش معنی دار میزان GTH-II نسبت به تیمار شم می شوند ($P < 0.05$).

در بخش نتایج بافتی تخمدان ماهی بنی در تمام گروهها سبز رنگ و بادامی شکل مشاهده شد و از لحاظ جنسی رسیده بودند، تیمارها در اندازه گیری های ماکروسکوپی تفاوت معنی داری نشان ندادند ($P > 0.05$). مطالعات میکروسکوپی نشان داد تخمدان ماهی بنی از نوع ناهمزمان بوده و فولیکولهای مراحل مختلف اووژنز قابل مشاهده بود و در تمام تیمارها اووژنز ۶ مرحله داشت.

نتایج مطالعات میکرومتری نشان داد که درصد فولیکولهای بالغ در هر دو تیمار گرلین افزایش معنی داری نسبت به تیمارهای شم و هیپوفیز نشان داد و در مقابل درصد فولیکولهای نابالغ کاهش معنی دار نسبت به تیمارهای شم و تیمار هیپوفیز داشت. ($P < 0.05$). در کلیه تیمارها هورمون گرلین سبب کاهش معنی دار قطر فولیکول در مراحل سه گانه زرده سازی نسبت به تیمارهای شم و هیپوفیز می شود ($P < 0.05$).

در بخش نتایج بازماندگی تخم و لارو از پنج تیمار بررسی شده فقط تیمار اول گرلین و هیپوفیز موفق به تخم کشی شدند. مقایسه همآوری دو تیمار فوق نشان داد تیمار هیپوفیز همآوری بالاتری نسبت به تیمار گرلین دارد ($P < 0.05$). از آنجایی که گرلین در هنگام گرسنگی افزایش می یابد لذا میزان پایین همآوری در مولدین تیمار شده با گرلین می تواند به دلیل گرسنه ماندن ماهیها و افزایش بیش از حد گرلین سیستمیک و در نتیجه اثر منفی آن بر روند رها سازی تخمک ها باشد. مطالعه و مقایسه درصد لقاح نشان دهنده افزایش معنی دار موفقیت لقاح در گروه تیمار گرلین نسبت به هیپوفیز است و محاسبه درصد تفریح نشان داد تیمار هیپوفیز افزایش معنی دار نسبت به تیمار گرلین دارد ($P < 0.05$). درصد بازماندگی لاروها در انکوباسیون تفاوت معنی داری میان دو تیمار گرلین و هیپوفیز نشان نداد ($P > 0.05$).

با توجه به نتایج بدست آمده گرلین بر فرایند رسیدگی جنسی اثر القائی مثبت داشته و مقایسات میان تیمارهای هیپوفیز و گرلین نشان می دهد، گرلین میزان هورمون GTH-II را به اندازه هیپوفیز افزایش می دهد، در ضمن گرلین درصد فولیکولهای بالغ بافت تخمدان را بیشتر از تیمار هیپوفیز افزایش می دهد؛ لذا گرلین بر رسیدگی جنسی ماهی اثر مثبت داشته و توصیه می شود در مطالعات آینده در تکثیر مصنوعی ماهی بنی مورد توجه قرار گیرد با این هدف که بتواند در آینده مشکل غیر فعال شدن تخمدان ماهی بنی ماده، که از مشکلات مرکز تکثیر ماهیان بومی است، برطرف نماید.



فصل اول

کلیات



یکی از منابع مهم تأمین غذایی جمعیت کشور، دریاها و آبهای داخلی آن است که سهم زیادی در تأمین پروتئین مورد نیاز دارد (ولی نژاد، ۱۳۷۳). از ماهیان با ارزش شیلاتی باربوس ماهیان هستند. گونه مورد نظر *Barbus sharpeyi* یکی از ۳۰۰ گونه باربوس در جهان است که به خانواده کپورماهیان Cyprinidae تعلق دارد و به زبان محلی بنی نامیده می شود (Almuhktar et al., 2006). زیستگاه اصلی این ماهی منطقه بین النهرین و هورالعظیم بوده (ولی نژاد، ۱۳۷۳) و پس از جنگ تحمیلی هر ساله رهاسازی لارو ماهی در هورالعظیم افزایش یافته است که در سال ۱۳۸۶ میزان رهاسازی ۲ میلیون و چهارصد هزار لارو بوده است. مناطق صید هورالعظیم، تالاب شادگان، دریاچه سد دز، کرخه، مارون، کارون ۳ و شهید عباسپور می باشد. میزان صید در سال مذکور ۵۳۹۰ تن ماهی بوده است. این ماهی در کشور عراق از منطقه هورالعظیم صید می شود (اداره کل شیلات خوزستان).

افزایش موفقیت آمیز این گونه در صورت بالا بودن قابلیت باروری آن امکان پذیر است و از دیدگاه فیزیولوژی هورمونها نقش مهمی در میزان تخم ماهیها دارند (ستاری، ۱۳۸۵). گرلین یک هورمون پپتیدی جدید و چند منظوره است که حدود ده سال از شناسایی و استخراج آن می گذرد و اولین بار در سلولهای اکسینتیک معده موش صحرایی شناسایی شد (Kotunia et al., 2006). جایگاه اولیه تولید گرلین در لوله گوارش بخصوص معده و تا حدودی در مغز، قلب و کلیه و آبشش و پانکراس و کلیه و استخوان می باشد (Kotunia et al., 2006 & Tritas et al., 2006). از نظر تعداد و ترتیب آمینواسیدی در گونه های مختلف ماهی تفاوتهای جزئی دارد اما می توان از گرلین انسانی با ۲۸ اسیدآمینو در مطالعات در مورد فیزیولوژی ماهی استفاده نمود (Uniappan et al., 2005). آزمایشات *In vivo* و *In vitro* نشان می دهد، گرلین بطور مستقیم بر هیپوفیز ماهی اثر گذاشته و با اثر بر گنادوتروپ ها رهایی هورمون GTH-II را تحریک می نماید (Unniappan et al., 2004). یکی از اعمال اصلی فیزیولوژیک این هورمون تنظیم ترشح هورمونهای هیپوفیزی (هورمون رشد، گنادوتروپ ها و پرولاکتین)، در ماهی می باشد (Unniappan et al., 2005).

با توجه به اینکه اثرات فیزیولوژیک گرلین از سال ۲۰۰۰ به بعد مطالعه شده است گونه های محدودی از ماهی مورد مطالعه قرار گرفته اند و نتایج در گونه های مختلف اختلافات بارز گونه ای نشان می دهد. به عنوان نمونه تزریق گرلین در گونه ای از مارماهی و تیلاپیا اثر مثبت بر ترشح پرولاکتین و در قزل آلا اثر منفی بر این هورمون دارد (Unniappan et al., 2005). لذا مطالعه و بررسی اثرات این هورمون بر ماهیان با ارزش شیلاتی ضروری به نظر می رسد.

از دیدگاه بافتی، تأثیر این هورمون بر گناد ماهیان مشخص نیست. لذا انجام تحقیقی که بتواند از دو دیدگاه خونی و بافتی اثر این هورمون را در ماهی بنی مشخص نماید و تأثیر مثبت، منفی یا حتی بدون تغییر آنرا گزارش نماید، ضروری می باشد.

در ضمن طبق گزارشات اداره کل شیلات خوزستان و مرکز تکثیر ماهیان بومی دشت آزادگان ماهیان مولد پرورشی بنی بعد از سه سال به دلایل نامعلومی قدرت باروری خود را در کارگاههای تکثیر از دست می دهند و قادر به تخمیزی نیستند علت این پدیده هنوز مورد سؤال است و برای از میان

برداشتن این مشکل نیاز به تحقیقات گسترده تر از طرف مؤسسات پژوهشی است. در ضمن در حال حاضر در مراکز تکثیر گونه مذکور توسط عصاره هیپوفیز بارور می شود و در زمینه استفاده از سایر هورمونهای سنتتیک تحقیق و کار علمی زیادی انجام نشده است. بسیار محتمل است که نتایج بهتری توسط هورمونهای دیگر گرفته شود. با توجه به اینکه هورمون گرلین با دوز پایین در بدن ماهیان وجود دارد و از طرف دیگر اثرات اندوکرینولوژیک آن اثبات شده است، لذا شایسته است میزان اثرات این هورمون بر رسیدگی جنسی ماهی بنی ارزیابی شود شاید از این طریق راهی یافت که مشکل باروری این ماهیان پس از ۳ سال برطرف شود.

بر این اساس اهداف تحقیق حاضر به ترتیب زیر می باشد:

- بررسی تأثیر خونی و بافتی گرلین در ماهی ماده بنی
 - بررسی میزان هماوری و باروری تخم، تخم های هچ شده و بازماندگی لارو
 - معرفی یک ماده جدید به جای هورمونهای هیپوفیزی در تکثیر مصنوعی ماهیان
- در تحقیق حاضر سعی شده است به سؤالات ذکر شده در ذیل پاسخ داده شود:
- آیا گرلین بر رسیدگی تخمدان ماهی بنی تأثیر دارد؟
 - میزان هورمون GTH-II (LH) تحت تأثیر گرلین چقدر است؟
 - بافت تخمدان قبل و پس از تزریق گرلین چه تغییری می کند؟
 - تعداد تخمکهای رها شده که قابلیت باروری دارند چقدر است؟
 - چه تعداد از تخم های لقاح یافته تفریح می شوند؟
 - چه میزان از تخم های تفریح شده به مرحله لاروی می رسند؟
 - آیا می توان گرلین را به عنوان ماده جایگزین عصاره های هیپوفیزی و هورمونهای هیپوتالاموسی معرفی کرد؟

بنابراین فرضیه های تحقیق به این صورت می باشند:

- گرلین میزان پلاسمایی هورمون GTH-II را بالا می برد.
- هورمون گرلین سبب ایجاد تغییرات بافتی مشخصی در تخمدان ماهیان تحت تیمار می شود.

۱-۱ گرلین

گرلین یک پپتید با چندین اسید آمینه است که منبع اصلی تولید آن معده است و سطح پلاسمایی آن با تغذیه تغییر می کند. در واقع این هورمون علاوه بر اثرات پاراکرینی در معده و تأثیر بر میزان ترشح اسید و حرکات معده ای، دارای اثرات اندوکرینی بسیاری است که از طریق جریان خون در بافت های دیگر انجام می شود (مشتاقی کاشانیان، ۱۳۸۷).

۱-۱-۱ اکتشاف گرلین

در دسامبر ۱۹۹۹ با کاربرد رسپتور هورمون رشد GHS-R و رسپتور ارفان، Kojima و همکارانش توانستند پروتئین آسیله شده و نوظهوری را استخراج کنند که یک آگونیست قوی برای گیرنده های ترشحی هورمون رشد پستانداران در موش صحرایی بود (Unniappan, et al., 2005). دانشمندان آن را به عنوان گرلین (Ghrelin) نامگذاری کردند. وجه تسمیه گرلین به علت اثر آن بر روی هورمون رشد است (مشتاقی کاشانیان، ۱۳۸۷).

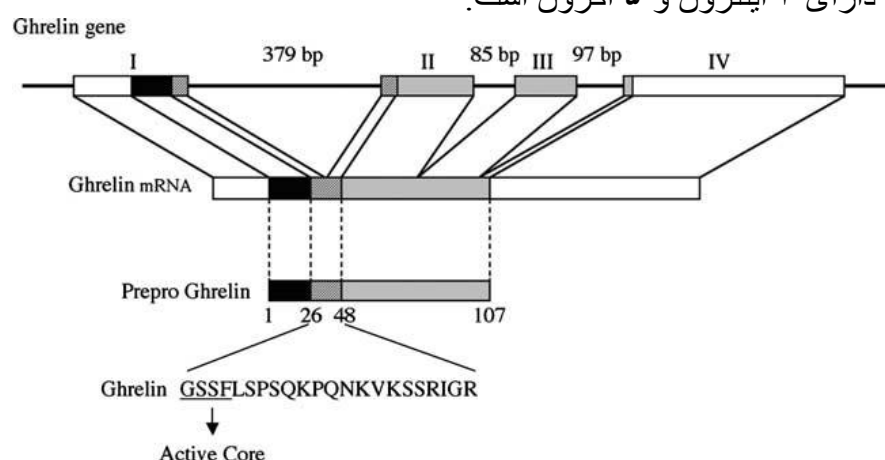
بخش اول این کلمه یعنی ghre از ریشه کلمه growth و پسوند آن -relین از ریشه کلمه releasing گرفته شده است. بنابراین نام این پپتید بیانگر یکی از عملکردهای مهم آن یعنی ترشح هورمون رشد است (Dupont, et al., 2007).

۱-۱-۲ ساختمان شیمیایی

- ژن گرلین

ساختار اینترون-اگزون ژن گرلین برای اولین بار در انسان گزارش شد (Wajnrath, et al., 2000). اخیراً ساختار ژن گرلین موش بررسی شده است و شامل ۵ اگزون و ۴ اینترون بوده (Tanaka, et al., 2001). ولی این ساختار در ژن گرلین انسانی شامل ۳ اینترون و ۴ اگزون است. مقایسه توالی ژنهای گرلین موش و انسان یک همسانی بالا و مشابه را در منطقه ای از یک کروموزوم نشان می دهد که دلیل حفاظت تکاملی ساختار ژن گرلین در پستانداران است (Unniappan, et al., 2005).

ژن گرلین ماهی طلایی (Goldfish) اولین مطالعه در مهره دار غیر پستاندار بود (Unniappan, et al., 2008). همانند نمونه انسانی ژن گرلین ماهی طلایی شامل ۳ اینترون و ۴ اگزون است. اخیراً ساختار ژن گرلین تیلاپیا (Parhar et al., 2003) و قزل آلا رنگین کمان (Kaiya et al., 2008) شناسایی شده است. ساختار اینترون-اگزون ژن گرلین در تیلاپیا با آنچه در ماهی طلایی گزارش شده یکسان است (شکل ۱-۱). ژن گرلین قزل آلا رنگین کمان یک اگزون کوتاه اضافی در انتهای ۵ دارد لذا مانند موشها دارای ۴ اینترون و ۵ اگزون است.



شکل ۱-۱ دیاگرام شماتیک ساختار اینترون-اگزون ژن گرلین در تیلاپیا

- پیتید گرلین

در بیشتر پستانداران گرلین ۲۸ اسید آمینه دارد (Van der ley et al., 2004). این پیتید در واقع یک پیش هورمون اولیه به نام پیش گرلین اولیه است که شامل مناطق پیتید نشانه، بالغ و پیتید انتهایی کربوکسیل است. تغییرات پس ترجمه ای شکل گرلین را عوض می کند (Unniappan, et al., 2005). پیتیدهای گرلین پستانداران، قورباغه های خشکی و آبی و مرغ (Kiaya et al., 2008) شناسایی شده اند. گروه آسیل برای بسیاری فعالیتهای بیولوژیکی پروتئین ضروری است و گرلین بدون گروه آسیل از لحاظ بیولوژیکی غیر فعال است (Kojima et al., 1999). طبق یافته های جدید، گرلین دومین هورمون شناخته شده از قبل تا بحال است که چنین تغییر پس ترجمه ای بی نظیری دارد و اولین هورمون کوله سیستوکینین است (Beinfeld et al., 1983)، سومین پیتید با این ویژگی که اخیراً کشف شده است نوروپیتید برومینه است (Tanaka et al., 2003). در میان ماهیان استخوانی، گرلین در گونه های زیر شناسایی شده است. ماهی طلایی گونه *Carassius auratus* (Unniappan et al., 2002) ؛ مار ماهی گونه *Anguilla anguilla* ؛ تیلاپیا موزامبیک *Oreochromus mossambique* (Kaiya et al., 2008) ؛ تیلاپیا نیل *Oreochromus niloticus* (Parhar et al., 2003) و قزل آلا رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss* (Kaiya, 2008) شناسایی شده است (شکل ۱-۲).

Goldfish : GTSFLSPAQKPQGRPPRM----- : 19
Eal : GSSFLSPSQRPQGKDKKPPRV----- : 21
Tilapia : GSSFLSPSQKPQNKVKSSRI----- : 20
Trout : GSSFLSPSQKPQVRQKGKGPVRV : 23

شکل ۱-۲ ردیف آمینو اسیدی پیتید گرلین در نمونه هایی از ماهیان استخوانی (Unniappan, 2005)

۳-۱-۱ انتشار گرلین در بدن جانوران

برای بررسی این مورد بیان mRNA و پروتئین گرلین در اندامهای مختلف جانوران محدودی ردیابی شده است. mRNA گرلین در معده، روده کوچک و بزرگ، پانکراس، کبد، قلب، شش، بافت چربی سفید، هیپوتالاموس، هیپوفیز و مغز جلویی موش صحرایی شناسایی شده است (Date et al., 2000). با کاربرد RT-PCR، بیان mRNA گرلین انسانی در معده، غده آدرنال، دهلیز، موکوس دهانی، مری، لوله فالوپ، بافت چربی، مثانه، لنفوسیت ها، ایلنوم، کلیه، کولون چپ، کبد، شش، غده لنفی، عضله، تخمدان، پانکراس، هیپوفیز، جفت، پروستات، کولون، پوست، طحال، بیضه، تیروئید و سیاهرگها دیده شده است (Gnaapavan et al., 2002). بیان mRNA گرلین در لنفوسیت های B و T هم تعیین شده است (Hattori et al., 2001). فقط گرلین در مغز انسان دارای مقادیر اندک است (Wren et al., 2002).

تکنیک فوق در ماهی طلایی نشان داد بیان mRNA گرلین در تلو سفال، هیپوتالاموس، روده، طحال و آبشش می باشد (Unniappan, et al., 2002). البته مکان اولیه این فرایند معده است و مغز بعنوان مکان دوم است (Unniappan, et al., 2004). در مار ماهی ژاپنی در معده، روده، مغز، قلب و کلیه mRNA گرلین بیان می شود. در قزل آلا رنگین کمان بیشترین بیان در معده و به دنبال آن در مغز و روده گزارش شده است. بیشترین بیان در معده تیلاپیا موزامبیک و بیان اندکی از آن در مغز، کلیه و

آبشش ها یافت شده است (Kaiya et al., 2003)، و در تیلاپیا نیل در معده آن است (Parhar et al., 2003). mRNA گرلین بیشتر در معده و لوله گوارش است و کمتر در مغز ماهیان قابل تشخیص است (Unniappan, et al., 2005).

۴-۱-۱ عملکردهای فیزیولوژیک شناخته شده گرلین

داده های اخیر دانشمندان موضوعات جدیدی را در کارکردهای فیزیولوژیک گرلین در پستانداران مطرح نمودند. در این بخش جزئیات عملکرد فیزیولوژیکی گرلین در ماهی و پستانداران مطالعه شده و در نهایت مورد مقایسه قرار می گیرد. در ماهی عملکرد فیزیولوژیکی اساسی گرلین تنظیم ترشح هورمونهای هیپوفیزی، تنظیم ورودی غذا و کنترل رفتار نوشیدن می باشد.

- تنظیم ترشح هیپوفیز

هورمون رشد (GH): نقش گرلین در تنظیم ترشح GH در شرایط آزمایش In vivo و In vitro و در موجوداتی چون موش صحرایی، خوک، گاو و انسان مطالعه شده است. در موش صحرایی، تزریق درون صفاقی (Interperitoneal Injection or IP) و تزریق مستمر درون بطن مغزی (Intercerebriventricular Injection or ICV) گرلین برای ۱۲ روز ترشح هورمون رشد را تحریک می کند (Kojima et al., 1999 & Date et al., 2000). در خوک (Glavaski et al., 2003) و گاو (Hashizume et al., 2003) آزادسازی هورمون رشد از سوماتوتروپها در محیط کشت را تحریک می کند.

نتایج نشان می دهد که گرلین می تواند به طور مستقیم بر روی هیپوفیز عمل کرده و باعث تنظیم آزاد سازی هورمون رشد در پستانداران می شود. پتانسیل اثر آزادسازی گرلین بر هورمون رشد قابل مقایسه با اثر هورمون آزادکننده هورمون رشد از هیپوتالاموس (GHRH) است (Gaytan et al., 2003).

در سال ۲۰۰۱ گرلین به صورت وریدی در انسانها مورد آزمایش قرار گرفت و سبب افزایش آزادسازی هورمون رشد در آنها گردید (Hattori et al., 2001). این در حالی است که اثرات آزادکنندگی هورمون رشد توسط گرلین در ماهی با بکارگیری گرلین انسانی مطالعه شد (Riley et al., 2005) و نشان داده شد که هر دو نوع فرم گرلین ماهی طلایی (فرم بلند و فرم کوتاه) سبب تحریک ترشح هورمون رشد در دو محیط درون بدن موجود زنده (In vivo) و درون محیط آزمایشگاه (In vitro) در انواع روشها می شود (Unniappan, et al., 2004). تزریق درون صفاقی گرلین قزل آلا رنگین کمان سبب تحریک سطوح پلاسمایی هورمون رشد ۳۰ دقیقه پس از تزریق می شود (Kaiya et al., 2003) و تزریق درون بطن مغزی گرلین ماهی طلایی سبب افزایش آزادسازی هورمون رشد ۳۰-۱۵ دقیقه پس از تزریق می شود که اگر چه مکانیسم پشت صحنه این اثرات ناشناخته است، اما گرلین تزریق شده از طریق رگهای خونی مغزی وارد هیپوفیز می شود و می تواند سبب تحریک رهایی هورمون رشد در ماهی شود و در یک محور هورمونی اثر مستقیم بر هیپوفیز دارد (Date et al., 2002). این نتایج حاکی از عملکرد مستقیم گرلین بر سوماتوتروپها برای تنظیم آزادسازی هورمون رشد می باشد اما مکانیسم عملکرد آن در ماهی هنوز ناشناخته است (Ahmed et al., 2002).

در سوماتوتروپهای خوک رهایی هورمون رشد توسط گرلین با بلوکه کردن فسفولیپاز C (PLC) یا پروتئین کیناز C (PKC) از بین رفته است و نشان دهنده نقش آنها در اثر گرلین بر رهای هورمون رشد می باشد (Grey et al., 2008). مهار آدنیلات سیکلاز (AC) و یا پروتئین کیناز A (PKA) هم

سبب مهار اثر گرلین بر رهایی هورمون رشد می شود (Malogon et al., 2003). علاوه بر این بلوکه کردن ورود خارج سلولی کلسیم در کانالهای حساس به ولتاژ کلسیمی (VSCC) سبب مهار اثر گرلین بر ترشح هورمون رشد از سوماتوتروپهای خوک می شود. لذا در سوماتوتروپهای خوک به عملکرد متناسب سه مسیر بین سلولی ذکر شده (VSCC, PLC/PKC, PKA/AC) برای تحریک رهایی هورمون رشد نیاز می باشد و فقدان عملکرد هر یک از آنها سبب توقف اثرات تحریکی خواهد شد (Tannenbaum et al., 1999).

مکانیسم های هدایت کننده در تنظیم ترشح هورمون رشد در ماهی طلایی تا حدودی بررسی شده است. (Chang et al., 2000) اصلی ترین مسیر شناخته شده در گونه فوق سیستم های VSCC, PKC, Ac/cAMP/PKA می باشد و احتمال دارد مانند سوماتوتروپهای خوک در ماهی طلایی، اثرات تحریکی گرلین بر هورمون رشد توسط یکی یا بیشتر از سیستم های ذکر شده انجام دهد. پر واضح است که مطالعات بیشتری برای درک سیستم های پیامبر دوم در عملکرد گرلین بر سوماتوتروپها در ماهیان استخوانی لازم است (Unniappan, et al, 2005).

هورمون (*LH/GTH-II*): اثرات گرلین بر روی هورمون LH و هورمون تحریک کننده فولیکول (FSH) در پستانداران بعثت گزارشات نامتناقض نا مشخص مانده است. Kojima در سال ۱۹۹۹ گزارش کرد که گرلین هیچ اثری بر ترشح LH و FSH در موش صحرایی ندارد. بر عکس یک مطالعه در موش صحرایی نشان داد که گرلین ترشح هر دو هورمون را در محیط *In vitro* تحریک می کند (Fernandez et al., 2004). در مطالعه ای دیگر تزریق گرلین به روش داخل بطنی مغز از فرکانس های پالس LH و افزایش غلظت آن جلوگیری می کند (Futura et al., 2001).

هورمون LH در ماهیان *GTH-II* نامیده می شود و در ماهی طلایی تزریق گرلین به سلولهای هیپوفیز محیط کشت سبب تحریک ترشح *GTH-II* می شود. (Unniappan et al., 2004).

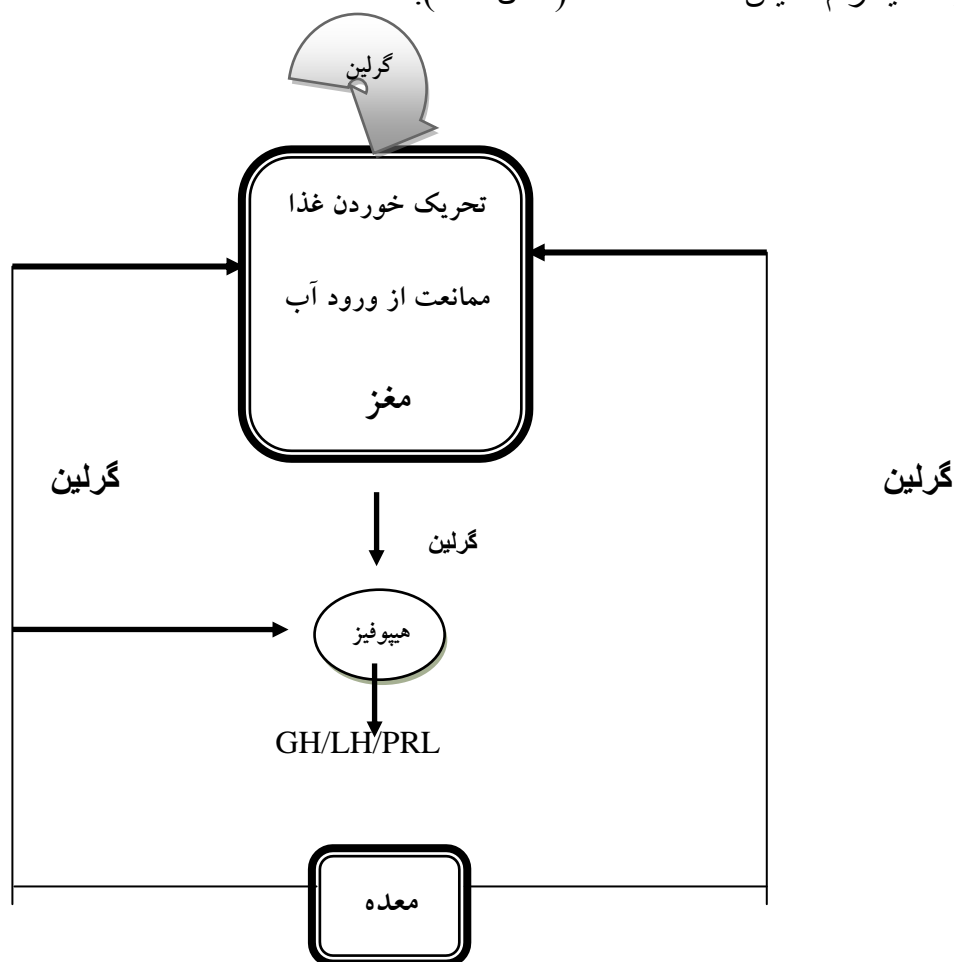
هر دو نوع تزریق *ICV* و *IP* سبب افزایش سطوح سرمی *GTH-II* در ماهی طلایی فقط ۶۰ دقیقه پس از تزریق می شود. این نتایج با نتایج مطالعات *In vitro* مطابقت دارد. بررسیها نشان داده اند که ورود خارج سلولی یون کلسیم از کانالهای نوع L (VSCC) و (PLC/PKC) دارای اثرات تحریکی بر فاکتورهای تنظیمی ترشح *GTH-II* است. چند نوع از این فاکتورها بیان mRNA هورمون *GTH-II* را تنظیم می کند (Yaron et al., 2003). دومین سیستم پیام آور که اثرات گرلین را بر رهایی LH در مهره داران وساطت می کند همچنان ناشناخته است.

مطالعات بیشتر بر روی انواع ماهیان استخوانی برای شناخت اثرات آزادسازی هورمون *GTH-II* بر گرلین و توضیح نقش آن در تنظیم رهایی *GTH-II* در شرایط *In vivo* و *In vitro* لازم است.

هورمون پرولاکتین (*PRL*): در موش صحرایی گرلین سبب تحریک ترشح پرولاکتین از هیپوفیز تیلایپا می شود (Riley et al., 2005). گرلین مارماهی و به طور مشابهی گرلین تیلایپا ترشح پرولاکتین را ۸-۲ ساعت پس از انکوباسیون تحریک می کند. اما هیچ اثری از تزریق گرلین در قزل آلا رنگین کمان بر ترشح پرولاکتین بدست نیامد (Kaiya et al., 2008). این تفاوت ها نشان دهنده عمل اختصاصی گرلین در گونه های مختلف بر ترشح پرولاکتین است (Gualillo et al. 2001). لذا مطالعات بیشتری برای شناخت اثرات گرلین بر روی بیان mRNA گرلین، بیوسنتز پرولاکتین و سیستم های پیامبر دوم هورمونی این مسیر لازم می باشد (Iqbal et al., 2006).

سوماتولاکتین (*SL*): این هورمون پروتئینی به طور ساختاری با GH و PRL مرتبط است. طبق آزمایشات انجام شده بر روی هیپوفیز قزل آلا رنگین کمان گرلین هیچ اثری در شرایط *In vitro* بر

روی میزان سوماتولاکتین سرمی ندارد (Kaiya et al., 2008). در تزریق درون صفاقی گرلین هم هیچ اثری بر SL دیده نشده است. این نتایج نشان می دهد گرلین نقشی در تنظیم ترشح SL ندارد (Takaya et al., 2000). اثرات گرلین بر ترشح SL دیگر گونه ها نیاز به بررسی بیشتر دارد. مسیرهای احتمالی گرلین از مغز و معده که سبب اثرات فیزیولوژیکی گفته شده در ماهیان می شود در یک دیاگرام نمایش داده شده است (شکل ۱-۳).



شکل ۱-۳ دیاگرام مسیرهای احتمالی گرلین از مغز و معده

- تنظیم ورود غذا

یکی از اثرات گرلین ایجاد تعادل مثبت انرژی است (Wang et al., 2007)، که این اثرات خود را از طرق مختلف مثل تحریک مصرف بیشتر غذا و القاء چربی سازی و همچنین کاهش دسترسی به چربی ها انجام می دهد (مشتاقی کاشانیان، ۱۳۸۷). مطالعات متعددی بر روی عملکرد تحریک اشتها توسط گرلین در پستانداران انجام شده است. در انسان یک افزایش پیش از غذا و یک کاهش پس از غذا خوردن در سطوح گرلین سرم خون به وجود می آید که نظریه عملکرد آغازین گرلین در امر غذا خوردن را تقویت می بخشد (Cumming et al., 2001). در پستانداران عمل تحریک تغذیه توسط

گرلین با کمک دیگر اشتها‌آورهای سیستمیک مانند NPY و AgRP و سلطنت می شود (Nakazato et al., 2007). در پستانداران رسپتور هورمون رشد در نورونهای NPY و AgRP دیده می شود و بلوکه نمودن این رسپتور با بی اثرسازی ایمنی آنها مانع از اثر گرلین در فرایند خوردن غذا در پستانداران می شود. (Nakazato et al., 2001) ارکسین هم پپتید تحریک اشتهای دیگری مانند گرلین است که اثرات اشتها در پستانداران را تنظیم می کند (Tashinai et al., 2003).

در ماهی طلایی تزریق‌ات IP و ICV گرلین انسانی و دو نوع گرلین ماهی طلایی (gGrL₁₂, gGrL₁₉) غذا خوردن ماهی را تحریک می کند (Unniappan et al., 2004).

تغییرات بیان mRNA گرلین در مغز و معده ماهی طلایی ردیابی شده است. یک کاهش پس تغذیه ای در بیان mRNA گرلین در هیپوتالاموس و معده ماهی طلایی دیده شده است (Lin et al., 2000). امساک از خوردن غذا، بیان mRNA گرلین را در هیپوتالاموس و معده ماهی طلایی در روز هفتم روزه داری افزایش می دهد (Unniappan et al., 2004). گرلین از بافت‌هایی چون معده و مغز تولید و رها می شود (و گاه از طحال و کبد) و ممکن است سبب افزایش سطوح گردش گرلین در ماهی طلایی در خلال روزه داری شود (Unniappan, et al., 2005). در ماهی طلایی هم رسپتورهای اشتها همانند NPY، گالانین، ارکسین، ملانوکورتین و AgRP تعیین شده اند. پپتیدهای ضد اشتها هم مانند بومبیزین و کوله سیستوکینین شناسایی شده اند که واکنش میان برخی از این دو گروه، تغذیه در ماهی طلایی را تنظیم می کند (Cumings et al., 2003). اما در ماهی واکنش گرلین با دیگر پپتیدهای تنظیمی اشتها هنوز ناشناخته است. mRNA گرلین در مناطق مغزی که ورودی غذا در ماهی را تنظیم می کند، بیان می شود (Asakawa et al., 2001).

- تنظیم ورود آب

گرلین مهار کننده بالقوه برای ورود آب در مارماهی گونه *Anguilla japonica* است (Kozaka et al., 2003) در میان بازدارنده های نوشیدن که توسط Kozaka و همکارانش تست شده است و شامل پپتید ناتریورتیک دهلیزی، گرلین، سروتونین، فنیل فرین، پرولاکتین و گاما آمینوبوتیریک اسید است، تزریق گرلین به روش داخل بطن مغز بیشترین اثر بازدارندگی را در فرایند نوشیدن آب است (Unniappan et al., 2005).

- اثر بر قلب و عروق

گرلین دارای اثرات قلبی-عروقی فراوان و بسیار جالب و مؤثری است که این اثرات خود را از طریق گیرنده های موجود در رگهای خونی و بطن های قلب انجام می دهد و در نهایت از طریق این اثرات باعث بهبود ساختمان و عملکرد قلب می شود (Nagaya et al., 2001).

هورمون رشد و واسطه های آن، فاکتور رشد شبه انسولینی هورمون های آنابولیکی هستند که برای رشد ماهیچه های اسکلتی و هموستاز متابولیک ضروری هستند. با در نظر گرفتن اثرات همودینامیکی و آنابولیکی، گرلین ممکن است دارای اثرات مفید و سودبخشی روی عملکرد بطن چپ قلب و متابولیسم انرژی در بیماران دچار نارسایی مزمن قلبی از طریق مکانیسم های وابسته به هورمون رشد داشته باشد (Okumura et al., 2002). مشاهده شده است در بیماری کاهش وزن و تحلیل ماهیچه ها، تزریق داخل رگی گرلین باعث کاهش فشار آرتریولی و افزایش بازده قلبی در بیماران می شود. این نتایج نشان می دهد گرلین دارای پتانسیل درمانی است و می توان از آن در نارسایی های شدید و مزمن قلبی استفاده کرد (Nagaya et al., 2001 & Shimizu et al., 2003). مطالعه در موش صحرایی نشان داده گرلین سبب کاهش فشار سرخرگی می شود (Yingizi et al., 2004).

- اثر بر سیستم ایمنی

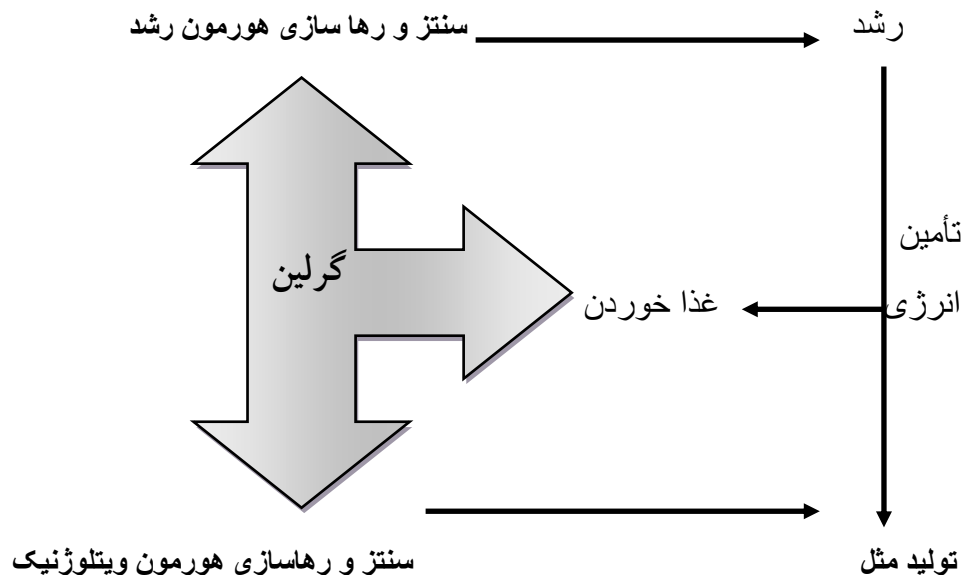
گرلین سبب تحریک عمل فاگوسیتوز در لوکوسیت های ماهی در خلال یک مسیر وابسته به گیرنده هورمون رشد می شود. گرلین مانع بیان پیش التهابی سیتوکین در لنفوسیت T و مونوسیت ها می شود لذا دارای نقش ایمنی می باشد و به نظر می رسد که گرلین هورمونی باشد که سبب تغییر بیان ژن هورمون رشد در سیستم ایمنی ماهی می شود. در واقع فاگوسیتوز یکی از مکانیسم های دفاعی اصلی در مهره داران اولیه است که توسط گرلین در ماهی فعال می شود (Yada et al., 2006).

- دیگر عملکردهای گرلین

بیان گرلین در معده تیلاپای ماده بیشتر از ماهی نر است که نشانه ای از عملکرد دی مورفیسم جنسی گرلین است. بیان گیرنده هورمون رشد در پوست، آبشش و کلیه قزل آلا نشان می دهد که گرلین سبب تنظیم پیگمانتاسیون و تنظیم اسمزی ماهیهای استخوانی می شود (Yada et al., 2006).

مطالعات اخیر نشان می دهد گرلین در شش، کلیه و قشر فوق کلیه وجود دارد و در فیزیولوژی استخوان تأثیر دارد (Yingizi et al., 2004).

خلاصه ای از عملکرد های احتمالی گرلین در تنظیم رشد، غذا خوردن و تولید مثل در ماهی طلایی، به صورت یک دیاگرام آورده شده است (شکل ۴-۱).



شکل ۴-۱ دیاگرام شماتیک عملکردهای احتمالی گرلین در رشد، تولید مثل و غذا خوردن

۱-۱-۵ عملکرد تولیدمثلی گرلین

گرلین و عملکرد گیرنده GHSR1a از حدود ۱۵ سال قبل مطالعه شده است و بررسی نشان داده که در سلولهای اصلی ارگانه‌های تولیدمثلی نر و ماده چندین گونه ماهی، پرنده و پستاندار بیان می‌شود که نشانگر نقش گرلین در فرایند تکامل و کنترل تولید مثل است (Tena-Sempere et al., 2005). نتیجه مطالعات *In vitro* و *In vivo* نشان می‌دهد که گرلین قادر به عمل در سطوح مختلف گناد-هیپوفیز-هیپوتالاموس می‌باشد (Dupont, et al., 2010). هیپوتالاموس منبع اصلی گرلین در سیستم عصبی مرکزی شناخته شده است (Wren et al., 2002). بعلاوه همانطور که قبلاً کشف شده است mRNA گیرنده هورمون رشد در بسیاری مناطق مغزی شناسایی شده است. در موش صحرایی استفاده سیستمیک از گرلین در محیط *In vivo* پالس GnRH را کاهش می‌دهد که باعث کاهش NPY است لذا گرلین بلوغ موش صحرایی را به تأخیر می‌اندازد. لذا این پپتید یک نقش کلیدی در عملکرد تولید مثلی دارد.

اثرات متضاد گرلین در میان پستانداران و چند گونه ماهی بدست آمده است. در حقیقت گرلین سبب تحریک ترشح GTH-II در ماهی طلایی و اخیراً کپور شده است اما مکانیسم ویژه و نقش این فعالسازی هنوز ناشناخته است (Dupont, et al., 2010).

- اثر بر فعالیت های تولیدمثلی نر

بیضه یک اندام ترکیبی درون ریز با سلولهای مختلف است که تحت تأثیر هورمونهای درون گنادی و برون گنادی و فاکتورهای رشد قرار دارد. برخی شواهد پیشنهاد می‌کنند که گرلین در این شبکه تنظیم کننده همکاری دارد (Martini et al., 2006).

طبق بررسی با رنگ ایمنی، گرلین اساساً در سلولهای لیدیگ جوندگان و گوسفند بیان می‌شود. در بیضه انسان گرلین در سلولهای سرتولی و لیدیگ وجود دارد اما در سلولهای جنسی وجود ندارد. بیان گرلین در سلولهای لیدیگ انسان ظاهراً مربوط به درجه تمایز سلولی می‌باشد.

شواهد هورمونی بررسی شده نشان می‌دهد که گرلین یک اثر غیر مستقیم بر اسپرماتوژنز دارد اما برخی تفاوت‌های گونه ای در محل یابی گرلین در بیضه وجود دارد. بر خلاف داده های انسان و جوندگان، در گوسفند بالغ فعالیت گرلین در طی مراحل اسپرماتوژنز افزایش می‌یابد (Dupont, et al., 2010).

اثر گرلین بر لوله اسپرم ساز موش صحرایی بالغ نشان می‌دهد که گرلین مانع بیان mRNA در سلولهای جنسی و مهار عملکرد لوله های اسپرم ساز می‌شود و این اعمال مهاری در لوله های اسپرم ساز ردیابی شده است.

در بررسی *In vitro* گرلین به طور معنی داری مانع ترشح HCG و cAMP و تستوسترون توسط مترشح از سلولهای لیدیگ می‌شود. نقش مهاری گرلین بر ترشح تستوسترون به کاهش تحریک HCG و بیان mRNA آن در مسیر استروئیدوزنیک همراه است.

در بررسی *In vivo* نتیجه کمی متفاوت بدست آمده است. در حقیقت در موش های تغذیه شده، گرلین سبب القاء کاهش توده بیضه بدون تغییر معنی دار در سطوح تستوسترون پلاسما می‌شود. اما در جانوران گرسنه که گرلین سیستمیک آنها افزایش می‌یابد تستوسترون پلاسما بطور معنی داری کاهش می‌یابد. لذا سطوح بالای گرلین می‌تواند سبب تغییر در محور تولیدمثلی شده و این امر وابسته به میزان انرژی در دسترس است (Dupont, et al., 2010).

طبق بررسی های *In vivo* تزریق گرلین سبب مهار سرعت تکثیر سلولی در سلولهای لیدیگ بیضه می شود.

بنابراین گرلین قادر به تعدیل عملکرد کلیدی بیضه چون فعالیت لوله های سمنی فر، ترشح تستوسترون و تکثیر سلول لیدیگ است و می تواند بعنوان یک تنظیم کننده تکامل بیضه عمل نماید (Dupont, et al., 2010).

- اثر بر فعالیت های تولید مثلی ماده

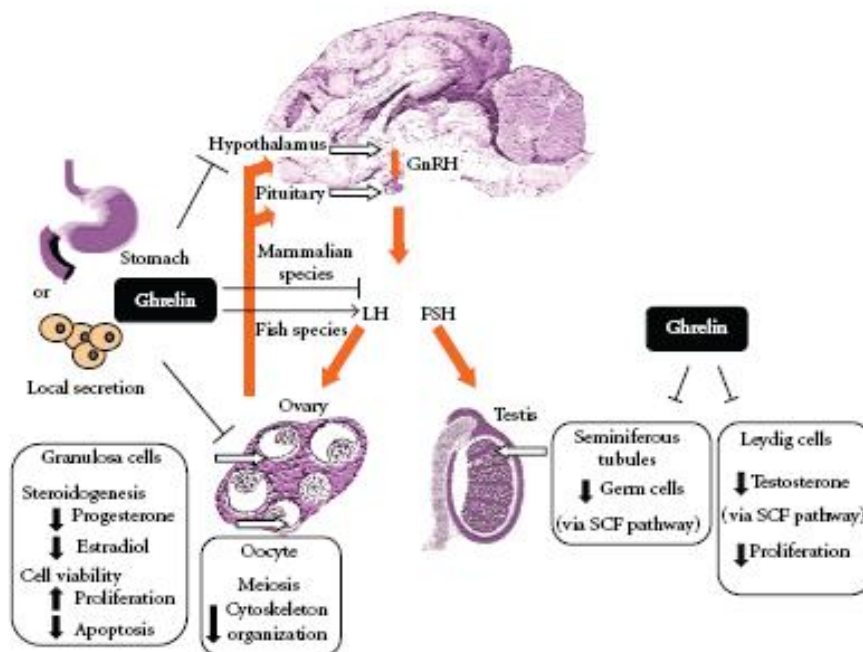
شواهد بدست آمده قویا نشان می دهد که گرلین و رسپتور آن GHS-R1a در تخمدان پستاندار و غیر پستاندار حضور دارد. بیان گیرنده گرلین در اووسیت ها در مراحل فولیکولی، لوتئالی، سطح سلولهای اپیتلیوم و بافت پیوندی تخمدانی در موش صحرایی گزارش شده است و این مشاهدات نشان می دهد که سلولهای فوق اهداف بالقوه برای عملکرد عمومی یا موضعی گرلین هستند و گرلین مستقیما روی آنها اثر دارد. کاربرد *In vivo* گرلین در موش صحرایی فولیکوژنز را تحت تأثیر قرار می دهد؛ در حقیقت گرلین قطر فولیکولها و تعداد سلولهای لوتئالی و قطر لایه تکا و گرانولوزا را کاهش می دهد (Dupont, et al., 2010).

تزریق درون رگی گرلین در بزهای ماده نژاد سانن سبب تغییر در میانگین غلظت LH پلازما در طی دوره حین تزریق می شود ولی تأثیری روی غلظت پلاسمایی FSH در این حیوانات نداشته است (فریفته، ۱۳۸۵).

در سلولهای گرانولوزای انسانی تیمار شده، گرلین اثر مهاری بر استروئیدزایی آنها دارد و در خرگوش سلولهای گرانولوزای تیمار شده، پروژسترون و استرادیول و پروستاگلاندین F کمتری نسبت به تیمار نشده ها ترشح می کنند. بر عکس نتایج فوق در سلولهای تکا و گرانولوزای فولیکولهای خوک گرلین سبب افزایش ترشح استرادیول از طریق تغییر در فعالیت آنزیمی آروماتاز می شود.

گرلین تکوین اولیه جنین موش را مهار می کند اما در مراحل بعدی در خوک اثرات افزایشی گرلین دیده شده است. لذا اثرات گرلین بر تکوین جنین چندان روشن نیست (Dupont, et al., 2010).

خلاصه ای از اثرات گرلین بر محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد در شکل ۱-۵ آورده شده است.



شکل ۱-۵ تأثیر گرلین بر محور HPG گرلین اساساً از معده ترشح می شود و از طریق عملکرد گیرنده گرلین (GSHR1a) بر کلیه بافت‌های دخیل در امر تولید مثل مانند هیپوتالاموس، هیپوفیز، بیضه و تخمدان اثر می گذارد. در تخمدان سبب اثرات گفته شده در فوق بر سلول‌های گرانولوزا و اووسیت؛ در بیضه نیز سبب تأثیراتی بر لوله های اسپرم ساز و سلول‌های لیدیگ می گردد (Dupont, et al., 2010).

۱-۲ فیزیولوژی تولیدمثل ماهی ماده

تولید مثل در ماهیان، به فعالیتهای هماهنگ هورمون های مختلف محور مغز-هیپوتالاموس-هیپوفیز-غدد جنسی بستگی دارد. به طور کلی وظایف تخمدان در ماهیان استخوانی تلئوست، نه تنها توسط هورمون های محرک غدد جنسی هیپوفیز (GTH-I, GTH-II) کنترل می شود، بلکه همچنین چندین هورمون و عوامل رشد دیگر به روش های اندوکراین، اتوکراین یا پاراکراین در این امر دخالت دارند. علاوه بر این، عوامل پاراکراین از درون هیپوفیز و فعالیت های خودتنظیمی هورمون های جنسی نیز در این امر دخالت دارند. ترشح عوامل هیپوتالاموس به نوبه خود، به صورت مستقیم یا غیر مستقیم، توسط پیام های حسی و همچنین فعالیت های خود تنظیمی هورمون های هیپوفیزی-غدد جنسی و سایر هورمون ها تنظیم می شود. بنابراین در هر سطحی از این محور، تعدادی محدود از سلول‌های هدف تحت تأثیر عوامل زیادی قرار می گیرند. پاسخ سلولی نهایی، حاصل اثرات پیچیده این عوامل تنظیم کننده بر روی عناصر تقویت کننده پیام های داخل سلولی است (ستاری، ۱۳۸۵).

۱-۲-۱ هورمون های گنادوتروپینی هیپوفیز

- ساختار هورمون های گنادوتروپینی

ویژگی دو هورمون محرک غدد جنسی به نامهای GTH-I و GTH-II در گونه های مختلف ماهیان استخوانی مشخص شده است. هورمون های گنادوتروپینی به فوق خانواده ای تعلق دارند که هورمون محرک تیروئید (TSH) نیز جزء آن می باشد. هورمون های این دو دسته (GTH, TSH) دارای یک زیر واحد آلفای عمومی به همراه یک زیر واحد بتای خاص می باشد (Li et al., 1998).

در ماهیان استخوانی بر خلاف پستانداران، دو نوع خاص از سلولهای محرک غدد جنسی، هورمون های GTH-I و GTH-II را تولید می کنند که معمولاً تصور می شود به ترتیب مشابه FSH و LH پستانداران باشند (Li et al., 1998 & Van der Kraak et al., 1997). زیر واحدهای آلفا و بتای هورمون های GTH پپتیدهایی غیر کووالانسی بوده که به ترتیب دارای ۱۱۳ و ۱۱۹ اسید آمینه می باشند و به وسیله ژن های جداگانه ای رمز می شوند (Li et al., 1998 & Van der Kraak et al., 1997). هر دو زیر واحد دارای باندهای دی سولفیدی داخل مولکولی بوده و در مکان های خاصی گلیکوزیله شده اند (Van der Kraak et al., 1997 & Sarasquete et al., 1997). قندهای موجود در گنادوتروپین ها شامل هگزوز، مانوز، گالاکتوز، هگزوزامین و N-استیل گلیکوزامین و متیل پنتوز می باشد. این هورمون ها همچنین حاوی اسید سیالیک هستند. با توجه به یکسان بودن زیر واحد آلفا در هر دو نوع هورمون GTH، زیر واحد بتا تعیین کننده خواص فیزیولوژی و بیوشیمیایی این دو نوع هورمون می باشد.

(Van der Kraak et al., 1997 & Sarasquete et al., 1997).

معمولاً اعتقاد بر این است که GTH-I در ویتلورنز و رشد اولیه غدد جنسی حائز اهمیت است در حالی که GTH-II وقایعی را تحریک می کند که منجر به بلوغ نهایی اووسیت و رسیدگی (اوولاسیون) می شود. مقادیر GTH-I در ویتلورنز و قبل از بلوغ جنسی کاهش می یابد. بر عکس، مقدار GTH-II تا قبل از رسیدگی (اوولاسیون) کم و غالباً غیر قابل تعیین است. مطالعات سیتوژنتیکی نشان می دهد سلولهایی که GTH-I را بیان می کنند، درست قبل از بلوغ وجود دارند در صورتی که سلول های بیان کننده GTH-II تنها در آغاز بلوغ مشاهده می شوند یا افزایش می یابند (ستاری، ۱۳۸۵).

- عوامل مؤثر بر آزادسازی هورمون گنادوتروپینی GTH-II

عوامل محرک

عوامل متعددی، آزادسازی GTH-II در ماهیان تلئوست را تحریک می کنند. نتایج آزمایشات محیط In vitro نشان داده است که آزادسازی GTH-II به طور مستقیم توسط هورمون آزاد کننده محرک غدد جنسی (GnRH)، نوراپینفرین (NE)، پپتید عصبی Y (NPY) و همچنین سروتونین، اکتیوپین / اینهیبین و نیکوتین تحریک می شود. بومبیسین، کوله سیستوکینین و گالانین نیز ترشح GTH-II را از فرآورده های باقی مانده هیپوفیز تحریک می کنند. برخی از این اثرات تحریکی توسط آزمایشات In vivo نیز تأیید شده است (ستاری، ۱۳۸۵). مطالعات ایمنی شیمی سلولی، نشان داده است که برخی از عوامل محرک ذکر شده، مستقیماً توسط سلولهای عصبی هیپوتالاموس آزاد می شوند و برخی منشأ پاراکرین داشته و از درون هیپوفیز ترشح می شوند (ستاری، ۱۳۸۵). در بین عوامل محرک، GnRH، تنظیم کننده عمومی و مهمی به حساب می آید (Saligaut et al., 1999).

اجسام سلولی عصبی که حاوی GnRH هستند، در سه ناحیه از مغز ماهیان تلئوست متمرکز شده اند و سه سیستم عصبی را تشکیل می دهند:

۱. دستگاه تالن سفال شکمی (VT) - پیش بصری قدامی (POA) هیپوتالاموسی؛
۲. دستگاه عصبی انتهایی؛
۳. دستگاه تگمنتوم مغز میانی.

برای رهاسازی GTH هیپوفیز، دستگاههای تگمنتوم مغز میانی و همچنین GnRH عصب انتهایی در تنظیم عصبی هورمونی مستقیم، نقش دارند (Kandel-Kfir et al., 2002).

مطالعات نشان می دهد که گرلین یک تنظیم کننده فیزیولوژیک برای رهای GTH-II در ماهی طلایی است و احتمالاً در مغز اثر کرده و سبب تنظیم رهایی و آزادسازی فاکتورهای تحریک کننده مؤثر بر ترشح GTH-II می شود (Broglia et al., 2003).

عوامل ممانعت کننده

در ماهیان تلئوست، ترشح GTH-II علاوه بر عوامل محرک عصبی هورمونی هیپوتالاموس، تحت کنترل عوامل ممانعت کننده هیپوتالاموس نیز قرار دارند. دوپامین (DA) مستقیماً از پاسخ ترشعی GTH-II ناشی از GnRH ممانعت به عمل می آورد و در بسیاری از گونه های ماهیان این کار را از طریق کاهش ترشح GTH-II از سطح سلولهای هیپوفیزی انجام می دهد (Saligaut et al., 1999 & Vacher et al., 2000). دوپامین علاوه بر اثر مستقیم در سطح سلول های محرک غدد جنسی، می تواند ورودی GnRH تحریک کننده را بر روی سلول های محرک غدد جنسی تغییر دهد و این امر را از طریق واکنش های متقابل با سلول های عصبی GnRH، هم در سطح بخش پیش بصری هیپوتالاموس و هم بخش پارس دیستالین انجام می دهد (ستاری، ۱۳۸۵).

در بسیاری از کپورماهیان تأثیر دوپامین ممانعت کننده داخلی آن قدر قوی است که توانایی GnRH تجویز شده را برای افزایش رهاسازی GTH-II شدیداً کاهش می دهد (vacher et al., 2000).

در ماهی طلایی ماده، مقادیر GTH-II سرم در خلال تخم ریزی و رسیدگی تخم (اوولاسیون) افزایش می یابد و این امر با کاهش مقدار شکل گیری دوپامین در مغز و تخلیه مقدار GnRH در ارتباط است. بر همین اساس، روش های متداول وادار کردن ماهیان به تخم ریزی، متکی به استعمال هم زمان یک ماده قوی آنتاگونیست (ضد) گیرنده دوپامین و آنالوگ (ترکیب مشابه) GnRH است (ستاری، ۱۳۸۵).

تغییرات فصلی

کنترل آزادسازی GTH-II توسط هیپوتالاموس در ماهیان استخوانی تحت تأثیر چرخه تولید مثلی فصلی یا چرخه بلوغ غدد جنسی قرار دارد. تغییرات ترشح GTH-II در خلال بلوغ غدد جنسی، احتمالاً با تفاوت های مربوط به ظرفیت ساختن این هورمون در ارتباط است (Gur et al., 2000a).

همراه با تغییرات فصلی حساسیت GTH-II ها به GnRH، تغییرات در دستگاه GnRH هیپوتالاموس نیز اتفاق می افتد. مراحل چرخه تولید مثلی، نه تنها کارایی نسبی عوامل عصبی هورمونی بر روی رهاسازی GTH-II را تنظیم می کنند، بلکه ممکن است بر روی فعالیت ممانعت کنندگی اثر تحریکی داشته باشند. نحوه تأثیر مراحل بلوغ غدد جنسی و عوامل فصلی بر روی تنظیم عصبی هورمونی GTH-I و GTH-II به خوبی شناخته نشده است اما احتمالاً این تغییرات به دلیل اثرات توأم خودتنظیمی استروئید و تأثیرات محیطی در سطح هیپوتالاموس و یا هیپوفیز است (ستاری، ۱۳۸۵).

عوامل محیطی و خارجی

چرخه های تولید مثلی ماهیان، پیوند نزدیکی با تغییرات محیطی، به خصوص تغییرات فصلی ساعات روشنایی روز و درجه حرارت دارد (سلامات، ۱۳۸۷). دوره نوری بر روی رشد و بلوغ غدد جنسی، چرخه روزانه مقدار GTH-II پلازما و همچنین رهاسازی GTH-II در پاسخ به ترکیبات مشابه (آنالوگ های) GnRH تأثیر می گذارد. این اطلاعات تا حدودی از طریق غده صنوبری و هورمون

مربوط به آن (ملاتونین) منتقل می شود و همچنین، سایر اطلاعات تنظیم کننده عصبی بر روی دستگاه GnRH در این امر نقش دارند. غده صنوبری به افزایش طول روشنایی روز و نیز به تحلیل غدد جنسی ناشی از دوره روشنایی کوتاه پاسخ می دهد (Glasswr et al., 2004 & Fraser et al., 2002).

مطالعات آزمایشگاهی نشان می دهد که دما عامل محیطی اصلی است که چرخه تولید مثلی را در بسیاری از ماهیان تنظیم می کند. اما تغییرات فتوپریود نیز نقش مهمی در این چرخه دارد (Kandel, 2002). Kfir et al., 2002. لذا درجه حرارت های کم و فتو پریودهای کوتاه (همانند آنچه در اواخر پاییز روی می دهد) رشد غدد جنسی را تسریع می کند. دمای بیشتر از ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتیگراد، بدون توجه به فتو پریود، مانع از تخم ریزی در بسیاری از ماهیان می گردد (Glasswr et al., 2002 & Fraser et al., 2004). در این میان، عوامل محیطی مختلف در تحریک تولید مثل، در گونه های مختلف، به طور قابل ملاحظه ای متفاوت است (سلامات، ۱۳۸۷).

استروئیدهای جنسی

نتایج حاصل از قطع غدد جنسی و جایگزین نمودن آن به هورمون در ماهیان بالغ و کاشتن ترکیبات ضد استروژنی در مغز نشان داد که در ماهیان تلئوست استرادیول و تستوسترون بر روی رهاسازی GnRH-II اثر خودتنظیمی منفی دارند. اثرات خودتنظیمی منفی استروئیدها بر روی ترشح GnRH-II، احتمالاً به واسطه اثرات غیر مستقیم آنها بر روی رهاسازی GnRH و کاهش اثر تحریکی حاصل از GABA و افزایش آهنگ ممانعت کنندگی دوپامین بر روی رهاسازی GnRH صورت می گیرد (ستاری، ۱۳۸۵). تأثیر غیر مستقیم خود تنظیمی منفی استروئیدهای جنسی، با تغییر خواص فیزیکی دستگاه GnRH نیز در ارتباط است (Ando et al., 2003).

استروئیدهای جنسی علاوه بر خودتنظیمی منفی، برای تقویت و رهاسازی GnRH-II ناشی از GnRH و همچنین افزایش مقدار GnRH-II هیپوفیز اثر خودتنظیمی مثبت اعمال می کنند بخشی از فعالیت خود تنظیمی مثبت استروئیدها ممکن است به واسطه اثر بر روی سلول های عصبی GnRH هیپوتالاموس نیز صورت می گیرد (Le Drean et al., 1996). فعالیت خودتنظیمی مثبت استروئیدها بر روی دستگاه GnRH هیپوتالاموس، ممکن است اختصاص به یکی از سلول های عصبی فرعی GnRH ناحیه VT-POA داشته باشد (ستاری، ۱۳۸۵).

احتمالاً استروئیدهای غدد جنسی یا ترشحات دیگر این غدد نیز در تفاوت های فصلی / بلوغ برای رهاسازی GnRH-I و GnRH-II به عنوان میانجی نقش دارند. به همراه سایر عوامل فصلی (برای مثال، دوره نوری) کم بودن مقادیر استروئیدهای غدد جنسی در گردش خون در خلال مراحل اولیه رشد غدد جنسی باعث افزایش تولید GnRH-I در این مرحله می شود. در نتیجه، هنگامی که غلظت استروئیدهای جنسی در خلال مراحل بعدی رشد تغییر می کند، این استروئیدها تولید و ترشح GnRH-I را متوقف می کنند در حالی که به تولید و ترشح GnRH-II یاری می رسانند. این امر منجر به بلوغ غدد جنسی می شود (Ando et al., 2004 & Dickey et al., 2000).

پیامبر های ثانویه

در سالهای اخیر، پیشرفتهای قابل ملاحظه ای در خصوص تفهیم مکانیسم های میانجی تحریک – ترشح سلول های GnRH-II ماهیان تلئوست بدست آمده است؛ که تنها مکانیسم های هدایت کننده برای کنترل GnRH و دوپامین مورد توجه بیشتری قرار گرفته اند.

نتایج حاصل از مطالعات انجام شده با استفاده از عوامل محرک نفوذ دهنده یون کلسیم به داخل سلول، عوامل ممانعت کننده ورود آن و همچنین عوامل حذف کننده این یون در خارج از سلول، نشان داده است که تحریک ناشی از GnRH بر روی رها سازی GTH-II در گونه های کپور ماهی بستگی به میزان دست یابی به یون کلسیم خارج سلولی دارد. جریان یافتن یون کلسیم به داخل، از طریق مجاری L شکل حساس به ولتاژ صورت می گیرد و احتمالاً ورود یون کلسیم خارج سلولی در اثر GnRH و به واسطه تغییر پتانسیل غشاء و فعالیت همزمان، افزایش می یابد. علاوه بر یون کلسیم خارج سلولی، سوخت و ساز کلسیم داخل سلولی نیز ممکن است واسطه تحریک سلول های GTH-II در اثر GnRH باشد. همانند GnRH، فعال کننده های پروتئین کیناز C یا PKC، باعث افزایش سوخت و ساز یون کلسیم داخل سلولی از طریق منابع داخل سلولی و خارج سلولی می شوند. PKC همچنین در فعالیت های خودتنظیمی مثبت مستقیم استروئیدهای جنسی دخالت دارد و این امر نشان می دهد که خودتنظیمی مثبت استروئیدها بر روی مسیرهای پیامبر ثانویه تأثیر می گذارد (Grey et al., 2008).

مسیر دیگر هدایت پیام که توسط GnRH برای تحریک رهاسازی GTH-II مورد استفاده قرار می گیرد، مسیر فسفولیپاز A2 یا PLA2- اسید آراشیدونیک یا AA است (ستاری، ۱۳۸۵).

در برخی گونه ها نیز دخالت روندهای وابسته به cAMP نیز در فعالیت GnRH برای رها سازی GTH-II نشان داده شده است، که البته ممکن است در بین ماهیان استخوانی تلئوست عمومیت نداشته باشد.

مطالعات اخیر مشارکت عوامل مبادله کننده یون سدیم / یون هیدروژن و همچنین تأثیر مستقیم جریان یون سدیم بر روی رها سازی GTH-II در ماهی طلایی نشان داده شده است (ستاری، ۱۳۸۵).

- سلولهای هدف هورمون های گنادوتروپینی

هدف اصلی هورمون GTH بافت تخمدان و اختصاصاً سلول های فولیکولی (سلول های گرانولوزا و تک) اطراف اووسیت های تخمدانی می باشد. در برخی گونه ها تنها یک نوع گیرنده GTH بر روی هر دو نوع سلول گرانولوزا و تک یافت شده است (Van der Geyten et al., 1998). در حالیکه در برخی دیگر دو نوع گیرنده مختلف GTH در تخمدان وجود دارد. اولین زیر واحد گیرنده GTH به نام GTH-RI به هر دو هورمون GTH-I و GTH-II متصل می شود، هر چند تمایل بیشتری به اتصال به GTH-I دارد، در حالیکه دومین زیر واحد به نام GTH-IIIRII اختصاصاً به GTH-II متصل می شود. GTH-RI بر روی سطح هر دو نوع سلول گرانولوزا و تک وجود دارد ولی GTH-RII فقط روی سطح سلول های گرانولوزا یافت می شود (Mishra et al., 2006). در سلول های گرانولوزای فولیکول های ویتلوزنی و فولیکول های پیش از تخم گذاری، GTH به ترتیب باعث تحریک تولید ۱۷-بتا استرادیول یا E₂ و هورمون القاء کننده بلوغ یا MH و ۱۷-آلفا ۲۰ بتا - دی هیدروکسی پروگنئون یا 17α20β-DP می شود (Mathews et al., 2002 & Kokokiris et al., 2000).

سلول های تک نیز در طی تمام مراحل تکامل فولیکول های تخمدانی، در پاسخ به GTH، تستسترون تولید می کنند. البته پاسخ این سلول ها به GTH در فولیکول های پیش از تخم گذاری عمدتاً تولید ۱۷-آلفا هیدروکسی پروژسترون می باشد (Kokokiris et al., 2000). بسته به بلوغ تخمدان، آنزیم های استروئید ساز متفاوتی در سلول های فولیکولی وجود دارند (سلامات، ۱۳۸۷).

۱-۲-۲ هورمون های استروئیدی تخمدان

- محل سنتز هورمونها

این هورمون ها در سلول های دارای شبکه آندوپلاسمی صاف وسیع و میتوکندری های لوله ای و نیز آنزیم هایی نظیر هیدروکسی استروئید دهیدروژناز یا 3β -HSD و گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز که به ترتیب مسئول اکسیداسیون و هیدروکسیلاسیون استروئیدها می باشند، تولید می شوند. هورمون های تخمدانی عمدتاً در سلول های تک سنتز می شوند. 3β -HSD در سلول های گرانولوزا و تک فولیکول های تخمدانی بسیاری از ماهیان یافت شده است (Redding et al., 2002).

- ساختار مولکولی هورمون ها

هورمون های استروئیدی، ترکیبات آلی حلقوی هستند که از کلسترول مشتق می شوند. عمده ترین استروئید های جنسی در ماهیان ۱۷- بتا- استرادیول (E_2) و تستوسترون (T) می باشند. هورمون های خانواده پروژسترون دارای ۲۱ کربن و استروژن ها ۱۸ کربن دارند. تولید هورمون های استروئیدی عمدتاً توسط آنزیم هایی که در مسیر سنتز این هورمون ها وجود دارند، تنظیم می شوند (Redding et al., 2002).

- سلولهای هدف هورمون های استروئیدی

هدف هورمون های استروئیدی عمدتاً سلولهای تخمدان می باشد، هر چند سلولهای مغز و کبد نیز هدف این هورمون ها محسوب می شوند. گیرنده های استروژنی متعلق به خانواده گیرنده های هسته ای می باشند. در حالت غیر فعال، این گیرنده ها در سطح هسته قرار دارند (Gelinas et al., 1997).

در ماهیان پروتئین های شوک حرارتی به صورت کمپلکس با این دو نوع گیرنده می باشند و باعث غیر فعال نگه داشتن آنها در سطح هسته و جلوگیری از اتصال این گیرنده ها به DNA می شوند. سپس استروئیدهای جنسی با انتشار از عرض غشاء پلاسمایی سلول هدف به ER متصل می شود، که منجر به شروع دیمریزاسیون و فسفوریلاسیون کمپلکس گیرنده / هورمون و نیز جدا شدن پروتئین های شوک حرارتی می گردد. به این ترتیب گیرنده های استروئیدی فعال شده و به ترکیباتی به نام عناصر پاسخ دهنده به هورمون در DNA سلول هدف متصل می شوند که باعث فعال شدن نسخه برداری ژن مربوطه می گردد (Tan et al., 1996 & Beato et al., 1996). گیرنده $17\alpha, 20\beta$ -DP بر روی غشاء پلاسمایی اووسیت ماهی واقع شده و تفاوت های بسیاری با سایر گیرنده های هورمون های استروئیدی دارا می باشد. گیرنده های $17\alpha, 20\beta$ -DP، تولید یک زیر واحد از پیامبر ثانویه سیتوزولی را تحریک می کنند که به آن فاکتور شروع کننده بلوغ یا MPF گفته می شود. MPF نهایتاً منجر به شکستن ژرمینال وزیکول یا GVBD و بلوغ اووسیت می شود (Nagahama et al., 1994).

۱-۲-۳ تغییرات هورمونی چرخه تولید مثلی ماده

ماهیان دارای بیشترین تنوع تولید مثلی در میان مهره داران می باشند. چرخه تولید مثلی ماهیان یک فرایند دینامیک می باشد که به عملکرد هماهنگ سطح وسیعی از هورمونهای محور هیپوتالاموس-هیپوفیز- تخمدان بستگی دارد.

- نقش هورمون های تخمدانی در اوژنز

اوژنز در ماهی به چرخه تکامل اووسیت اطلاق می گردد که فرایندی پیوسته بوده و می توان آن را بر اساس تغییرات فیزیولوژیکی به چهار مرحله تقسیم نمود (Nagahama et al., 1994).

در طی مرحله پیش ویتلوژنز، اووسیت توسط دو لایه سلولی گرانولوزا و تک پوشیده شده است. هر دو نوع سلول (گرانولوزا و تک) محل تولید هورمون های استروئید جنسی و نیز ساخت مولکول های فعال دیگری نظیر فاکتورهای رشد، پروستاگلاندین ها و سیتوکین ها می باشند (Van der Kraak et al., 1997). در این مرحله لایه غیر سلولی زونا رادیاتا بین سلول های گرانولوزا و اووسیت هر فولیکول تخمدانی تشکیل می شود.

بیشتر حجم اووسیت در طی مرحله ویتلوژنز صورت می گیرد. پس از طی مرحله ویتلوژنز و کمی قبل از تخم گذاری، اووسیت بالغ می شود. تمام مراحل اوژنز به وسیله هورمون ها و فاکتورهای رشد تنظیم می شود. سلول های سوماتیک نقش مهمی در تنظیم تکامل تخمدان در طی مرحله ویتلوژنز ایفا می کنند (Van der Kraak et al., 1997 & Nagahama et al., 1994). در تمام گونه های ماهیان استخوانی مطالعه شده، میزان ۱۷ بتا- استرادیول خون در طی این مرحله افزایش قابل توجهی می یابد و آزمایشات کشت سلولی نشان می دهد که هر دو لایه گرانولوزا و تک در این افزایش هورمونی نقش دارند (پورمهدی بروجنی، ۱۳۷۹).

در لایه تک در پاسخ به GTH-I از کلسترول، آندروژن ها بیوسنتز شده و سپس آندروژن های تولیدی (آندروستندیون و تستوسترون) به لایه سلول های گرانولوزا انتقال یافته و توسط آنزیم آروماتاز حلقوی شده و به ۱۷ بتا-استرادیول تبدیل می شوند (Cerda et al., 1998). ۱۷ بتا-استرادیول پس از تولید و رها شدن به جریان خون، باعث سنتز ویتلوژنین (گلیکوفسفوپروتئین پیش زرده ساز تخم) از سلول های کبدی می شود. ویتلوژنین پس از ورود به جریان خون، به تخمدان رفته و پس از عبور از لایه سلول های گرانولوزا و تک به گیرنده های خاص خود در سطح اووسیت متصل می شود (Cerda et al., 1998 & Kokokiris et al., 2000).

به دنبال مرحله ویتلوژنز و قبل از مرحله تخم گذاری، اووسیت ها وارد مرحله بلوغ می شوند (Cerda et al., 1998 & Kokokiris et al., 2000). در بیشتر ماهیان استخوانی، بلوغ اووسیت توسط سه سری از واسطه ها حاصل می شود (Nagahama et al., 1994). اولین واسطه رشد و بلوغ اووسیت در ماهیان، هورمون های گنادوتروپینی می باشند. در بیشتر ماهیان استخوانی GTH-II هورمون گنادوتروپینی غالب موجود در پلاسما و هیپوفیز در طی مرحله بلوغ اووسیت می باشد (Planas et al., 2003 & Swanson et al., 2000). از طرفی جدا نمودن لایه سلول های گرانولوزا و تک اطراف اووسیت، توانایی هورمون های گنادوتروپینی برای القاء بلوغ اووسیت را در شرایط *In vitro* از بین می برد. به این ترتیب می توان پی برد که عملکرد هورمون های گنادوتروپینی، وابسته به دومین واسطه بلوغ می باشد. هورمون های گنادوتروپینی سلول های فولیکولی را به منظور تولید استروئیدهایی که باعث بلوغ می شوند تحریک می کنند تا این استروئیدها به نوبه خود روی سطح اووسیت عمل کرده و موجب بلوغ شوند (Planas et al., 2000 & Cerda et al., 1998).

مشخص شده است که برخی از هورمون های استروئیدی C_{21} شروع کننده GVBD در شرایط *In vitro* می باشد (Nagahama et al., 1994). به هر حال تنها دو استروئید درون زا به عنوان هورمون القاء کننده بلوغ (MH) شناسایی شده است. مطالعات انجام شده روی برخی ماهیان نشان می دهد که هورمون های گنادوتروپینی مستقیماً روی لایه گرانولوزا اثر کرده و موجب تحریک آنزیم 20β -HSD می شوند و بر این مبنای در طی بلوغ اووسیت، هورمون 17α -OHP (پیش ساز بلوغ) تحت تأثیر

هورمون های گنادوتروپینی در لایه تک سنتز شده و سپس به سلول های گرانولوزا نفوذ کرده و به تعدادی از سوبستراهای مورد نیاز جهت ساخت عامل بلوغ $17\alpha,20\beta$ -DP تبدیل می شود (Nagahama et al., 1994).

مطالعات جدید نشان داده است که بافت های غیر جنسی نظیر چشم، خون و حتی ماهیچه ها توانایی تولید هورمون های استروئیدی را دارند. اگر چه به دلیل در دسترس نبودن هورمون مورد نیاز 17α -OHP عملا در شرایط بدن این پدیده اتفاق نمی افتد. اعتقاد بر این است که هورمون های GTH باعث تنظیم افزایشی فعالیت آنزیم 20β -HSD و تنظیم کاهشی فعالیت آروماتاز می شوند (Redding et al., 2002).

عملکرد هورمون های گنادوتروپینی و استروئیدهای بلوغ به سومین واسطه های بلوغ اووسیت یعنی فاکتور شروع کننده بلوغ MPF وابسته است. MPF باعث تحریک اووسیت برای از سرگیری تقسیم میوز و مرحله آخر یعنی مرحله تخمک گذاری می شود (Nagahama et al., 1994).

- سایر تنظیم کننده های شیمیایی اووژنز

اگر چه هورمون های استروئیدی، هورمون های اصلی تخمدان می باشند، فاکتورهای دیگری نیز در اووژنز دخالت دارند. اخیرا گیرنده های فاکتور رشد شبه انسولینی یا IGF-F و انسولینی بر روی سلول های گرانولوزا و تک فولیکول های آزاد ماهیان یافت شده است که احتمالا این دو هورمون نقش مهمی در تنظیم رشد تخمدان و استروئیدوزن قبل از بلوغ، دارا می باشند (Maestro et al., 1997). گیرنده های فاکتور رشد اپیدرمی یا EGF روی فولیکول های تخمدان ماهی طلایی وجود دارد که به نظر می رسد در تنظیم روند تولید استروئیدها و پروستاگلاندین ها دخالت داشته باشند (Pati et al., 1998). هورمون های پپتیدی نظیر انسولین، پرولاکتین و هورمون رشد نیز بر اووژنز تأثیر دارند هر چند نقش و اهمیت فیزیولوژیکی آنها در اووژنز هنوز مشخص نیست (سلامات، ۱۳۸۷).

۳-۱ مورفولوژی و ساختار بافتی تخمدان ماهی

در اکثر ماهیان استخوانی، تخمدان ها یک جفت اندام توخالی بوده که به وسیله مزواریوم از دیواره پشتی حفره شکمی آویزان می شوند که به این نوع تخمدان ها، تخمدانهای کیستی گفته می شود. تخمدانهای ماهی بنی به صورت یک زوج ساختار طویل بوده که در طول قسمت جانبی و شکمی کیسه شنا، در زیر دیواره محوطه بطنی قرار گرفته اند و در قسمت خلفی به یکدیگر متصل شده و از طریق منفذ تناسلی به خارج باز می شوند (پورمهدی بروجنی، ۱۳۷۹ و محمد نظری، ۱۳۷۲).

در ماهی نابالغ تخمدان نواری شکل می باشد ولی در ماهی رسیده تخمدان تمام محوطه بطنی را پر کرده و سطح مقطع آن تقریبا گرد است. بافت تخمدان از سلول های اووگونی، اووسیت ها و سلول های فولیکولی اطراف آن، بافت داربست (استروما) و بافت عصبی تشکیل شده است (پورمهدی بروجنی، ۱۳۷۹).

در کپور ماهیان، تخمدان توسط لایه احشایی صفاق پوشیده شده و در زیر آن لایه ظریف سفید پرده از جنس بافت همبند سست قرار می گیرد. تیغه های تخمک زا به داخل تخمدان نفوذ می کند و تولید تخمک یا اووژنز در این تیغه ها صورت می گیرد و سپس فولیکولها حاوی اووسیت های بالغ از تیغه ها به حفره تخمدانی آزاد شده و پس از عبور از مجرای تخم بر از طریق منفذ تناسلی از بدن خارج می شود (Takashi et al., 1994). کپورماهیان فعالیت جنسی دوره ای داشته و ظاهر تخمدان در هر مرحله از دوره تخمدانی متفاوت می باشد. از نظر چگونگی رشد فولیکولها، تخمدان ماهی بنی از نوع

ناهمزمان Asynchronous or Metachrone می باشد. در این نوع تخمدان، اووسیتها در مراحل مختلف رشد قرار دارند (پورمهدی بروجنی، ۱۳۷۹).

۱-۳-۱ اووژنز

سلول های اووگونی در طول چین های سفید پرده قرار داشته و توسط بافت همبند ناچیزی احاطه می شوند، این سلول ها دارای یک هسته بزرگ با هستکی مشخص می باشند و با تقسیم میتوزی به اووسیت اولیه تبدیل می شوند (Trant et al., 1989). بزرگ شدن اووسیت عمدتاً به علت تجمع زرده می باشد، سپس اووسیت آب جذب کرده و شفاف می شود. معیارهای استفاده شده برای تفکیک مراحل مختلف اووژنز، اندازه، مقدار، انتشار مواد داخل سلولی خصوصاً گرانولهای زرده و مورفولوژی کروموزومها می باشد (پورمهدی بروجنی، ۱۳۷۹).

اووژنز با تکثیر سلول های اووگونیوم در تیغه های تخمک زا شروع می شود. طول دوره تکثیر در گونه های مختلف متفاوت می باشد (Clelland et al., 2009). مراحل مختلف رشد میکروسکوپی اووسیت ماهی بنی به شش مرحله قابل تقسیم است:

مرحله I کروماتین-نوکلئولوس

ویژگی این مرحله اتصال هستک به رشته های کروماتین می باشد. سیتوپلاسم اووسیت کمی بازوفیلی است ولی هسته کاملاً بازوفیلی بوده و یک یا چند هستک تیره در آن دیده می شود (Clelland et al., 2009).

مرحله II پری نوکلئولوس

در این مرحله قطر اووسیت افزایش یافته و از ماهیت بازوفیلی سیتوپلاسم کاسته می شود. در خلال این دوره (مرحله دیپلوتن میوز) کروموزوم های لامپ برآش شکل می گیرند و درست قبل از پاره شدن ژرمینال وزیکول (GVBD) در هنگام بلوغ اووسیت ناپدید می شوند. در مرحله پری نوکلئولوس اکثر ماهیان استخوانی، یک توده خارج هسته ای بازوفیلی به وجود آمده که آن را هسته زرده ای یا اجسام بالبیانی می نامند. بررسی های انجام شده با میکروسکوپ الکترونی نشان داد این اجسام ساختمان یکنواختی نداشته و از اندامک های سلولی نظیر میتوکندری، دستگاه گلژی، شبکه آندوپلاسمی صاف، دانه های چند وزیکولی و گرانول های چربی تشکیل شده و به نظر می رسد مرکز شکل گیری اندامک های سلولی باشد (Bieniars et al., 1997 & Bjerregaard et al., 2008).

III مرحله تشکیل قطرات چربی

در این مرحله قطر اووسیت افزایش یافته و وزیکول های چربی و زرده در سیتوپلاسم ظاهر می شوند. سیتوپلاسم همچنان بازوفیلی باقی مانده و شکل هسته نامنظم می شود (پورمهدی بروجنی، ۱۳۷۹ و شکری بوسجین، ۱۳۷۴).

مرحله IV زرده سازی اولیه

این مرحله با ظهور گرانول های زرده ای اسیدوفیل در قسمت محیطی سیتوپلاسم مشخص می شود. سیتوپلاسم خاصیت بازوفیلی بسیار ضعیفی داشته و قطر اووسیت افزایش می یابد (Bjerregaard et al., 1995 & Palmer et al., 2008).

مرحله V زرده سازی ثانویه

در این مرحله قطر اووسیت افزایش یافته، تعداد وزیکولهای چربی و گرانولهای زرده ای افزایش می یابد و به طرف مرکز حرکت می کنند. سیتوپلاسم کاملاً اسیدوفیلی شده و به دلیل وجود گرانولهای زرده ای به صورت دانه دار دیده می شود (Bjerregaard et al., 2008).

مرحله VI زرده سازی ثالثیه

در این مرحله اووسیت به رشد نهایی رسیده، تعداد گرانولهای زرده ای افزایش یافته و تعدادی از آنها با هم یکی می شوند. سیتوپلاسم اووسیت کاملاً اسیدوفیل بوده و هسته مشاهده نمی شود. در این مرحله اووسیتها کاملاً حساس و شکننده بوده و در هنگام تهیه برش ممکن است در برخورد با تیغه میکروتوم پاره شوند. در این مرحله تخمک گذاری کرده یا دچار آترزی شده و جذب می شود (Palmer et al., 1995).

۱-۳-۲ تشخیص میزان رسیدگی غدد تناسلی کپورماهیان

میزان رسیدگی غدد تناسلی ماهی طبق روش ۶ مرحله ای، بر اساس علائم زیر تعیین می شود (فرید پاک، ۱۳۸۵):

مرحله I ماهی های نابالغ: غدد جنسی رشد ننموده و به صورت قیطان یا نوارهای کشیده ای می باشند که در مجاورت هم و در پهلو و پایین تر از کیسه شنا قرار گرفته اند و با چشم غیر مسلح تشخیص جنسیت آنها مقدور نمی باشد.

مرحله II ماهی های در حال رشد یا ماهی های بعد از تخم کشی: غدد جنسی در حال رشد هستند. غدد جنسی قیطانی شکل و ضخیم تر شده و امکان تعیین جنس ماهی امکان پذیر است. در این مرحله تخمک ها به اندازه ای هستند که با چشم غیر مسلح دیده نمی شوند. در امتداد تخمدان در طرف مشرف به وسط بدن، رگه خونی کاملاً مشخص موجود می باشد.

مرحله III غدد جنسی نارس هستند اما نسبتاً رشد نموده اند: تخمدان ها رشد نموده و یک سوم الی یک دوم تمامی حفره شکمی را پر کرده و پر از تخمک های ریز غیر شفاف سفید رنگ می باشند که با چشم غیر مسلح کاملاً قابل تشخیص هستند. اگر تخمدان بریده شده و محل برش با چاقو خراشیده شود، تخمک ها به سختی از جداره داخلی تخمدان کنده شده و همواره گودی هایی را تشکیل می دهند که دارای چند عدد تخمک می باشد.

مرحله IV ماهی هایی که غدد تناسلی آنها به بیشترین رشد خود رسیده و کاملاً رسیده اند: تخمدان ها خیلی بزرگ بوده و تا دو سوم حفره شکمی را پر می نمایند. تخمک ها درشت و شفاف بوده و با فشار آوردن به شکم ماهی، مقداری از آنها از منفذ تناسلی به صورت توده تخمک های بهم چسبیده خارج می گردد. در صورت برش تخمدان و خراشیدن سطح برش با چاقو، تخمک ها به آسانی، بدون ترکیدن و

جدا از هم (بطور تکی) از تخمدان جدا می گردند. این مرحله طولانی بوده و ممکن است گاهی چندین ماه بدون هیچگونه تغییری در حالت خواب یا سکون باقی بماند.

مرحله ۷ ماهی ها با تخمک های سیال (ریزشی): تخمک ها به اندازه ای رسیده می باشند که در صورت فشار جزئی، به راحتی از منفذ تناسلی خارج می گردند. اگر ماهی را از سر گرفته و به طور عمودی نگهداشته و تکان دهیم، تخم، آزادانه از منفذ تناسلی خارج می شود.

مرحله ۷ ماهی های تخم ریزی کرده (تخم کشی شده): تخمک ها کاملاً ریخته یا کشیده شده اند. حفره بدن با اندام های داخلی هنوز پر نشده است. تخمدان ها خیلی کوچک، شل، ملتهب و به رنگ قرمز تیره می باشند. گاهی در تخمدان ها تعدادی تخمک کوچک باقی می ماند که تجزیه شده و به وسیله ماهی جذب می گردد. پس از چند روز التهاب برطرف گردیده و غدد جنسی به مرحله II رسیدگی باز می گردند.

اگر تخمک ها بین دو مرحله از ۶ مرحله گفته شده، قرار گرفته باشند و یا تشخیص دقیق آنها مقدور نباشد، در این صورت مرحله رسیدگی به وسیله دو عدد مشخص می گردد و مرحله ای که جلوتر نوشته می شود نزدیک تر می باشد. برای مثال III-IV یعنی به مرحله سه نزدیک تر است (فرید پاک، ۱۳۸۵).

۳-۳-۱ ویتلورنز

ویتلورنز به معنی تولید زرده است و دلیل اصلی بزرگ شدن اووسیت تجمع زرده می باشد. (پورمهدی بروجنی، ۱۳۷۹). در ماهیان استخوانی سه نوع مواد زرده ای (قطرات چربی، وزیکولهای زرده و گلبولهای زرده) وجود دارد. ترتیب ظاهر شدن مواد زرده ای در گونه های مختلف ماهیان استخوانی با یکدیگر متفاوت می باشد، به طوریکه در برخی گونه ها ابتدا وزیکولهای زرده ای و بلافاصله بعد قطرات چربی تشکیل می شوند، اما در گونه ای دیگر ابتدا قطرات چربی و بعد وزیکولهای زرده ای ظاهر می شوند (Redding et al., 2002).

قطرات چربی از گلیسیرید و مقدار کمی کلسترول تشکیل شده اند و ابتدا در اطراف هسته ظاهر شده و سپس در مراحل بعدی به طرف محیط سیتوپلاسم مهاجرت می کنند. این قطرات در مقاطع معمولی پارافینی به شکل واکوئولهای مدور دیده می شوند. وزیکولهای زرده شامل موکوپلی ساکارید و گلیکوپروتئین بوده و با انوزین به رنگ قرمز در می آیند، اما واکنش PAS شدیداً مثبتی دارند. این مواد اولین موادی هستند که در سیتوپلاسم اووسیت در طی رشد ثانویه اووسیت و ابتدا در قسمت قشری و قشری میانی اووسیت ظاهر می شوند (Redding et al., 2002 & Strussmann et al., 2002).

همزمان با رشد اووسیت، تعداد و اندازه وزیکول های زرده افزایش می یابد و در هنگام بلوغ به سمت محیط حرکت کرده و به عنوان آلئول قشری شناخته می شوند (Redding et al., 2002). در زمان لقاح نقش این آلئول ها در واکنش های قشری اثبات شده است. موقعی که تخم تلقیح می شود، محتویات این آلئول ها به داخل فضای پری ویتلین آزاد می شود (شکری بوسجین، ۱۳۷۴). بررسی های میکروسکوپی نشان داده است که گلبول های زرده از اتصال وزیکول های کوچک که ابتدا در محیط اووسیت ظاهر می شوند به وجود می آید. با پیشرفت ویتلورنز قسمت اعظم سیتوپلاسم تخم های رسیده با گلبول های زرده که توسط غشایی احاطه شده اند، پر می شود (Redding et al., 2002). گلبول های زرده رنگ انوزین را به خود گرفته و دارای واکنش PAS مثبت ضعیفی می باشند (Strussmann et al., 2002).

در ماهیان استخوانی همچون سایر مهره داران غیر پستاندار، پروتئین مخصوص ماده یابوتلورژنین به وسیله کبد در پاسخ به ۱۷ بتا استرادیول ساخته شده و از راه خون به تخمدان می رسد (Redding et al., 2002 & Strussmann et al., 2002). شواهد میکروسکوپی حاکی از آن است که پیش سازهای زرده از راه میکروپینوسیتوز وارد اووسیت می شوند. میکروویلی فولیکولی محل مبادله مواد بین سلول های فولیکولی و اووسیت است (سلامات، ۱۳۸۷).

۱-۳-۴ اووسیت های تحلیل رفته

در تخمدان کپورماهیان، دیدن اووسیت های تحلیل رفته معمول می باشد که احتمالا در اثر استرس محیطی به وجود می آیند. اصطلاحا به آتروفی سلول های گرانولوزا و احتمالا سلول های تک، آترزی فولیکولی گفته می شود که امکان وقوع آن در هر مرحله از رشد فولیکولی وجود دارد. در اکثر بررسی ها آترزی فولیکولی به چهار مرحله پی در پی تقسیم می شود (پورمهدی بروجنی، ۱۳۷۹).

در مرحله اول هسته و لایه سلول های تاج پره ای دچار آسیب شده و مواد زرده ای از خارج لایه تاج پره ای به وسیله سلول های گرانولوزا جذب می شود. در مرحله دوم هسته ناپدید شده، شکسته شدن لایه تاج پره ای ادامه یافته و جذب مواد زرده ای باعث می شود که سیتوپلاسم اووسیت آترزی و کم رنگ شود. در مرحله سوم لایه سلول های تاج پره ای ناپدید شده و سیتوپلاسم سریعاً توسط سلول های گرانولوزا فاگوسیتوز می شود و در مرحله آخر تنها دیواره اووسیت (سلول های گرانولوزا و تک) باقی مانده و به صورت مدور یا کلاپس دیده می شود که به زودی از بین می رود (Palmer et al., 1995).

۱-۳-۵ بلوغ اووسیت

در ماهیان اووسیت پس از کامل شدن رشد، شروع به تقسیم می کند. در ماهیان استخوانی همانند سایر مهره داران هر اووسیت کاملاً رشد یافته، دارای یک هسته بزرگ (ژرمینال و زیکول) در پروفاز میوز یک است. معمولاً ژرمینال و زیکول به علت سیتوپلاسم تیره از خارج قابل مشاهده نمی باشد. استفاده از ماده ثبوتی، شفافیت زرده را افزایش داده و در زیر نور، ژرمینال و زیکول به رنگ قهوه ای طلایی دیده می شود. در فاز انتهایی ویتلورژنز، کروی بودن اووسیت کم شده و مقداری پهن می شود. قطب حیوانی در یکی از سطوح پهن شده و اطراف یک فرو رفتگی در فولیکول و لایه سلولی تاج پره ای به نام میکروپیل قرار می گیرد (Palmer et al., 1995).

ژرمینال و زیکول که ابتدا در مرکز یا بین مرکز و محیط بوده، به سمت محیط، محل قرار گیری میکروپیل، حرکت می کند. سپس غشای آن پاره شده و محتویات آن با سیتوپلاسم مخلوط می شود. در طی بلوغ اووسیت علاوه بر تغییراتی که در هسته رخ می دهد در سیتوپلاسم قطرات چربی و گلبول های زرده به هم متصل شده و به علت جذب آب، اندازه و شفافیت اووسیت زیادتر می شود. در مراحل انتهایی بلوغ، اووپلاسم یا پلاک زرده ای و شبکه اندوپلاسمی که در سراسر سیتوپلاسم کشیده شده، پُر می شود و آلئول های قشری در زیر غشاء زرده قرار می گیرند (Palmer, 1995).

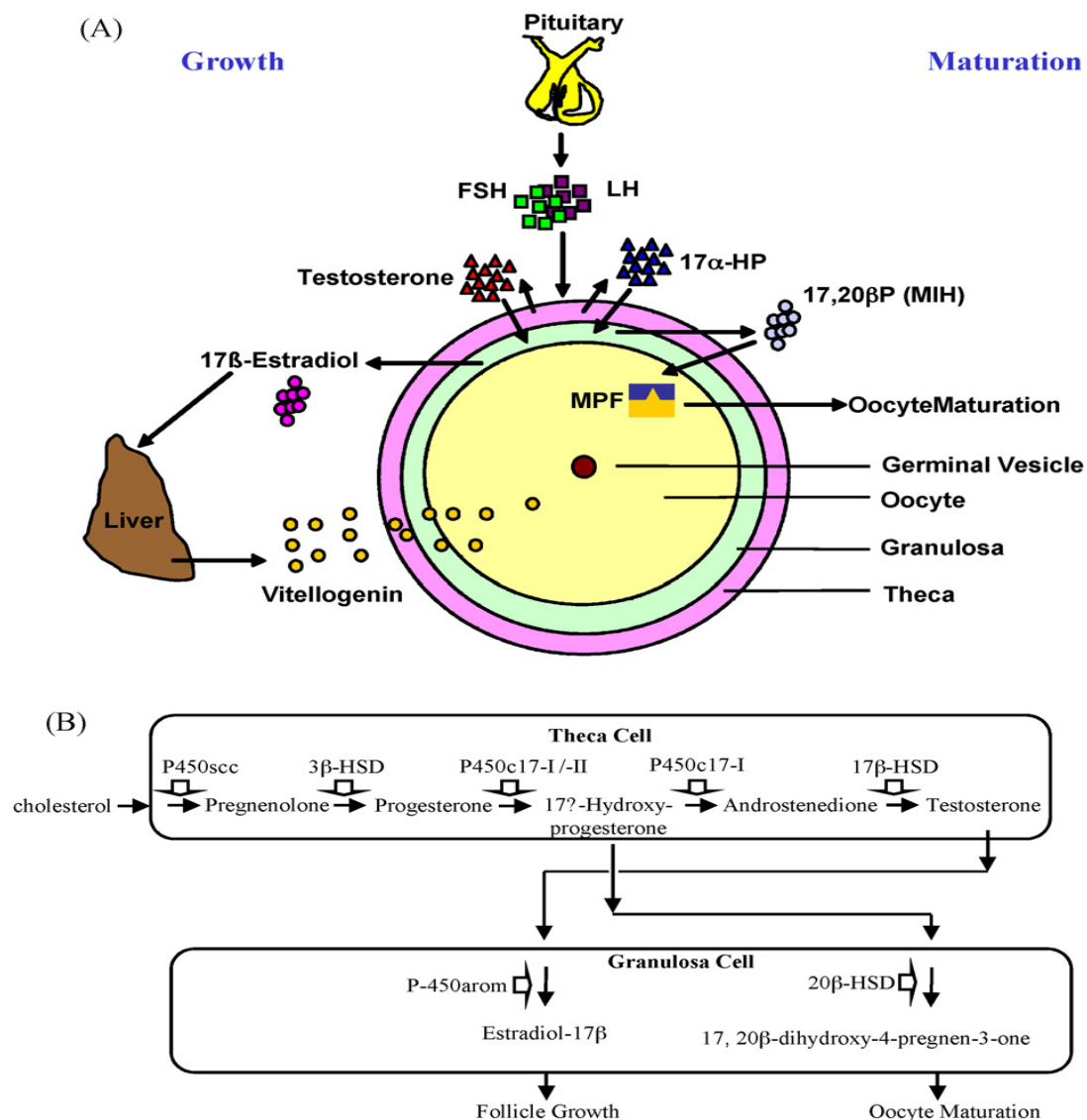
۱-۳-۶ تخمک گذاری

بعد از تقسیم میوز یک، اووسیت به داخل حفره تخمدانی یا حفره شکمی آزاد شده، که این فرایند تخمک گذاری نام دارد. تخم های آزاد شده، تقسیم میوزی را تا مرحله متافاز میوز دو ادامه داده تا تخم آماده لقاح شود. به هر حال رسیدگی اووسیت همیشه با تخمک گذاری همراه نبوده و ممکن است تحلیل رود (ستاری، ۱۳۸۵).

مراحل تخمک گذاری در ماهیان استخوانی به این قرار می باشد:

ابتدا باید لایه فولیکولی از اووسیت جدا شود. مطالعات میکروسکوپی نشان می دهد که میکروویلی سلول فولیکولی و اووسیت در نزدیکی تخمک گذاری از روی غشاء تخم کنار رفته و فضای گسترده ای میان سلول فولیکولی و غشاء تخم به وجود می آید. اگر چه مکانیسمی که منجر به قطع اتصال اووسیت به فولیکول قبل از تخمک گذاری می شود، هنوز نامشخص مانده است ولی احتمالاً آنزیم های پروتئولیتیک دخیل هستند. مطالعات میکروسکوپی انجام شده بر اووسیت ماهیان استخوانی نشان می دهد، در نزدیکی زمان تخمک گذاری اجزای منقبض شونده ای مانند میکروفیلامنت بر روی سلول های تک به وجود می آید و ثابت شده است که فعالیت میکروفیلامنت ها برای تخمک گذاری ضروری می باشد (پورمهدی بروجنی، ۱۳۷۹).

کلیه مراحل رشد و بلوغ اووسیت در شکل ۱-۶ نمایش داده شده است.



شکل ۱-۶ مراحل رشد و بلوغ اووسیت (Clelland, 2009): A: اثرات هورمونی و کبدی بر رشد و بلوغ اووسیت نمایش داده شده است. B: نقش هورمونی لایه های سلولی تکا و گرانولوزا بر رشد فولیکول و بلوغ نهایی اووسیت نمایش داده شده است.

۴-۱ تکثیر مصنوعی

در تحقیق حاضر، نوعی از تکثیر مصنوعی انجام می شود که با تولید تخم از طریق لقاح مصنوعی و کنترل شده شروع گردیده، با درآمدن نوزادها و پرورش آنها و بچه ماهی ها ادامه می یابد.

۱-۴-۱ علل نیازمندی به تکثیر مصنوعی

بعضی از دخالت های انسان در عمل زاد و ولد طبیعی ماهی های پرورشی و یا قابل پرورش می تواند کمک مؤثری در حفظ نسل ماهی ها باشد. تکثیر مصنوعی ماهی، انسان را درگیر دخالت هایی در عمل زاد و ولد طبیعی ماهی ها نموده است که دارای مزایای زیر می باشد:

۱. افزایش میزان لقاح و تعداد نوزادها
۲. حمایت از ماهی ها در مقابل دشمنان و شرایط نامساعد محیط زیست
۳. ایجاد شرایط بهتر برای رشد و حفظ نسل ماهی ها (فریدپاک، ۱۳۸۷)

۱-۴-۲ تکنولوژی تکثیر مصنوعی ماهی

تکثیر مصنوعی ماهی های گرمابی عبارت از مجموعه اقداماتی است که در گونه های مختلف ماهی ها کاربرد دارند. مراحل تکثیر به شرح زیر می باشد:

۱. صید ماهی های مولد (وحشی) در محل تخم ریزی طبیعی آنها

وجود ماهی های مولد رسیده از لحاظ مواد تناسلی لازمه هرگونه اقدام در تکثیر مصنوعی ماهی می باشد. ماهی های مولد ممکن است از آب های طبیعی و در محل های تخم ریزی طبیعی، کمی قبل از قبل تخم ریزی صید شده باشند و یا از ماهی های پرورش داده شده در کارگاههای پرورش ماهی انتخاب گردند (هوروات، ۱۳۸۱).

به طور کلی کار کردن با ماهی های وحشی (صید شده در آبگیرهای طبیعی)، به مراتب مشکل تر از کار کردن با ماهی های اهلی (پرورش یافته در استخرهای مصنوعی) می باشد و ممکن است همراه با ماهی های مولد وحشی، انواع انگلها به کارگاه پرورش ماهی آورده شود. اما در کارگاههای پرورش مولدین، امکان تشکیل گله های مولد و گزینش ماهی سالم، برای اصلاح نژاد مولدین وجود دارد و به خاطر همین امر، به طور وسیع در تمام دنیا مورد استفاده قرار می گیرد. در استخرهای ویژه پرورش مولدین، عوامل مختلف از قبیل درجه حرارت آب، نور، میزان اکسیژن، تراکم ماهی های مولد در واحد سطح، تأمین آرامش، وسعت و عمق استخرها و میزان غذا را باید با توجه به نیازمندیهای طبیعی گونه مربوطه تأمین نمود (فرید پاک، ۱۳۸۷).

به منظور گزینش ماهی مولد برای تزریق با هورمون وجود این علائم در مولد ماده ضروری است: شکم ماهی گردد، برجسته و نرم می باشد. پر بودن شکم تا قسمت خلفی آن و منفذ تناسلی ادامه دارد (فرید پاک، ۱۳۸۷).

۲. القاء رسیدگی تخمک ها و تخم ریزی با تزریق هورمون

رسیدن تخمک ها و تخم ریزی القاء شده از طریق عصاره غده هیپوفیز، به منزله کوتاه کردن جریان طبیعی می باشد. در این روش، هورمون گنادوتروپیک ترشح شده توسط غده هیپوفیز برخی از ماهی های دیگر، به ماهی مولد تزریق و موجب رسیدگی نهایی تخمک ها می شود (فرید پاک، ۱۳۸۷).

میزان هورمون مورد نیاز در ماهی های یک گونه و در روش های مختلف، متفاوت می باشد. در مناطق گرمسیری باید دقت نمود که ماهی دچار ضایعات هورمونی ناشی از بالا بودن دوز تزریق نگردند (جدول ۱-۱). به طور کلی هورمون در دو مرحله یعنی مرحله مقدماتی (آمادگی) و مرحله نهایی (قطعی) تزریق می گردد (هوروات، ۱۳۸۱).

جدول ۱-۱ دستورالعمل تزریق ماهی بنی (مرکز تکثیر اداره شیلات خوزستان)

دستورالعمل تزریق ماهی بنی (درجه حرارت ۲۳ درجه سانتیگراد)

زمان: صفر (تزریق اولیه ۱۰٪ دوز مورد استفاده)

زمان: ۱۲ ساعت (تزریق نهایی ۹۰٪ دوز مورد استفاده)

زمان رسیدگی جنسی: ۱۱-۱۳ ساعت پس از تزریق دوم

رسیدن تخمک ها و خارج شدن آنها از تخمدان، آخرین فاز رشد تخم می باشد. مرحله پیش رسیدگی تخمک ها با شروع حرکت هسته سلول از مرکز به طرف میکروپیل شروع می گردد. طی این مدت تخمک مقدار زیادی آب جذب می نمایند، لذا به نام مرحله هیدراسیون شناخته می شود. مرحله آمادگی کامل تخمک ها با اولین تقسیم میوزی خاتمه می یابد. همزمان با این عمل، فولیکول ها که تخمک را چسبیده به دیواره تخمدان نگه می دارند، خرد شده و هر کدام جداگانه حل می گردند و در نتیجه تخمک ها آزاد شده و به حفره تخمدان منتقل می گردند. توده تخمک ها در این مرحله می توانند آزادانه از منفذ تناسلی خارج گردند (فرید پاک، ۱۳۸۷).

نوسان درجه حرارت آب و کاهش مقدار اکسیژن می تواند تأثیر منفی بر مولدین گذارد (هوروات، ۱۳۸۱) و حتی از رسیدگی جنسی جلوگیری نماید (جدول ۲-۱).

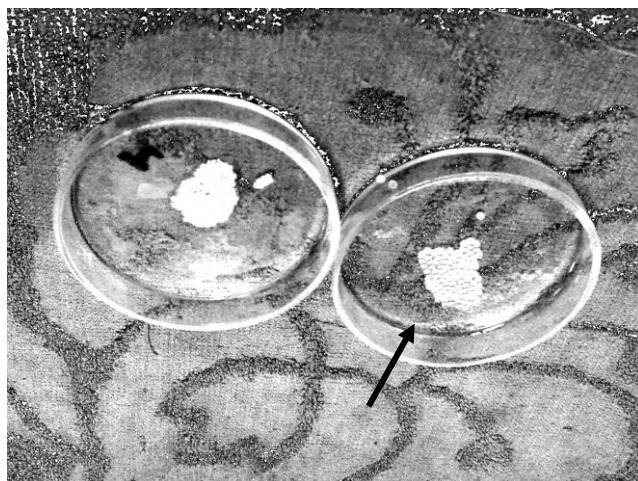
جدول ۲-۱ اثر دما بر رسیدگی جنسی

دما (درجه سانتیگراد)	زمان (ساعت)
۱۳-۱۶	۱۸
۱۲-۱۵	۲۰
۱۱-۱۴	۲۲
۱۱-۱۳	۲۳
۱۰-۱۲	۲۵

۳. تخم کشی و لقاح مصنوعی

برای تخم کشی، ماهی مولد یکبار بیهوش می گردد (از محلول MS-222 دو تا سه بار در طول ۲۴ ساعت می توان استفاده نمود). ماهی بیهوش شده را بلند کرده و بر روی میز تخم کشی قرار داده و آن را با حوله تمیزی کاملاً خشک می نمایند و از طریق مالش شکمی از سر به دم ماهی تخم های رسیده استحصال می شود. تخم ها درون ظروف پلاستیکی که قبلاً توزین شده اند ریخته شده و وزن دقیق آنها یادداشت می شود. سپس اسپرم نرهای بیهوش شده (و تزریق شده با عصاره هیپوفیز) در داخل لوله های شیشه ای کوچک جمع آوری می شود.

معمولاً ۱-۲ میلی لیتر اسپرم برای مخلوط کردن با تخمک های یک مولد ماده بنی کافی است. با پَر یا قاشق های پلاستیکی اسپرم و تخمک بطور کامل و به آرامی مخلوط می شود. می توان از محلول لقاح کاربامید بعنوان کاتالیزور در عمل لقاح تخمها استفاده نمود. در طول مدت چند دقیقه، اسپرم وارد سوراخ میکروپیل تخمک ها شده و لقاح صورت می گیرد. افزودن محلول لقاح موجب جذب آب و تورم تخمها می شود و وجود مولکولهای فعال آب روی سطح تخمها، موجب چسبندگی آنها می گردد که بهم زدن مداوم از چسبندگی تخمها با یکدیگر جلوگیری می نماید. چند بار آب روی تخم ها که مایع شیرینی رنگی شده است دور ریخته می شود. بعد از نیم ساعت اول، میزان هم زدن را کاهش داده اما هوز تعویض آب انجام می شود. تخم ها به اندازه چند برابر حجم اولیه شان متورم گشته و پوسته تخم ها کاملاً حالت ارتجاعی می یابد (شکل ۷-۱).



شکل ۱-۷ تغییر حجم تخم شستشو یافته

در پایان جذب آب و تورم تخم ها، می توان آنها را به درون شیشه های قیفی شکل زوک (شیشه های زوک، شیشه های ۷ لیتری پرورش تخم می باشد و از اسم شهر "زوک" سوئیس که برای اولین بار در آنجا ساخته شده، گرفته شده است) انتقال داد (هوروات، ۱۳۸۱).

۴. انکوباسیون تخمها و بیرون آمدن نوزادها

تخم های لقاح یافته به زودی شروع به رشد می نمایند. در هنگام رشد تخم های ماهی، رویدادهای پیچیده ای رخ می دهد. برای رشد صحیح تخم ها و بقاء بهتر آنها، تخم ها را در انکوباتور قرار می دهند و در آنجا تخم ها در شرایط مساعد، برای نمو طبیعی نگهداری می شوند. تخم ها در مدت انکوباسیون، نمو جنینی خود را در داخل پوسته تخم طی می نمایند و با پاره کردن پوسته تخم به صورت نوزاد از آن خارج می گردند که به آن هچ یا تفریخ گفته می شود (فریدپاک، ۱۳۸۷). در زمان تفریخ، تکامل جنین با رنگدانه سیاه چشم بسیار قابل توجه بوده و حرکت بیشتر جنین در داخل تخم را می توان مشاهده نمود (هوروات، ۱۳۸۱). این مدت برای ماهی بنی در دمای ۲۳ درجه سانتیگراد حدود ۷۲ ساعت طول می کشد.

پاره کردن پوسته تخم یک عمل مکانیکی است، اما آنزیم های تولید شده در داخل تخم نیز به این کار کمک می کند. تحت تأثیر درجه حرارت آب انکوباتور است. لذا در آب گرم بعلت بالا بودن سوخت و ساز بدن، سریعتر انجام می شود. اما دما از حد ایمنی ممانعت فراتر رود (Woyanovich et al., 1980). در این مرحله جدا نمودن نوزادها از پوسته های تخم، تخم های مرده و سایر مواد زائد لازم است که می توان از طریق شیمیایی و با به کار بردن آنزیم های پروتئاز از نوزادان فعال و سالم جداسازی نمود (Huet, 1970).

تکنولوژی انکوباسیون تخم ماهی: با توجه به این که رشد تخم های ماهیان گرمسیری سریع انجام می گیرد، لذا تشخیص و تفکیک مراحل رشد آنها مشکل می باشد. مهمترین مراحل قابل تشخیص عبارتند از: آب کشیدن (متورم شدن) تخم ها، رشد نطفه و مراحل جنینی، با مراقبت صحیح در طی این مراحل و قرار دادن تخم ها در انکوباتورهای مناسب، سلامتی و ماندگاری تخم ها تأمین خواهد شد (فریدپاک، ۱۳۸۷).

نیازهای تخم ماهی در مراحل رشد: تخم ماهی در تمام مدت رشد خود نیاز مداوم به تراکم اکسیژن زیاد دارد. مصرف اکسیژن تخم ها در مراحل اولیه ناچیز می باشد ولی با پیشرفت رشد تخم ها، به طور

قابل توجهی افزایش می یابد. برای نمو طبیعی و سالم تخم های ماهی، درجه حرارت مناسب آبی که ماهی در شرایط طبیعی با آن سازگاری یافته است می بایستی تأمین گردد. لذا در تمام مدت انکوباسیون باید درجه حرارت آب در حد مطلوب نگه داشته شود. مهیا بودن آب تمیز و فاقد پلانکتون، از نیازهای دیگر می باشد (Huet, 1970).

علل تلفات تخم ماهی در مدت انکوباسیون: تخمک های لقاح یافته در صورت مهیا شدن شرایط محیطی گفته شده معمولاً به طور طبیعی رشد می نمایند. اما در شرایط کارگاهی بعثت کمبود اکسیژن در برخی قسمت های انکوباتور که تعویض آب در آن ضعیف است و یا درجه حرارت نامناسب، برخی تخم ها در مرحله جنینی تلف خواهند شد (Bardach et al., 1972). تخم هایی که به طور طبیعی رشد می نمایند شفاف و براق بوده و محتویات آنها روشن می باشد. این تخم ها از تخم های بد و ناسالم که سفید و مات بوده و دارای محتویات کدری می باشند به آسانی قابل تشخیص هستند (Huet, 1970). لذا تعیین میزان لقاح تخم ها یا درصد باروری بایستی در این مرحله انجام گیرد که با نمونه برداری از لوله های قیفی انکوباتور و شمارش تخم ها قابل محاسبه است (فریدپاک، ۱۳۸۱).

انواع انکوباتورها قیفی شکل مورد استفاده در شکل ۱-۸ آورده شده است که از لحاظ جنس ماده مورد استفاده با یکدیگر متفاوتند و اشکال و اندازه های آنها نیز تا حدودی فرق دارد.

۵. پرورش نوزاد، نوزاد ماهی و بچه ماهی انگشت قد

نوزاد تازه از پوسته تخم درآمده با ماهی بالغ تفاوت زیادی دارد. نوزادها فاقد اندام های دهان، روده، شکم، آبشش و کیسه شنا می باشند. کیسه زرده مواد و انرژی لازم را برای رشد و نمو تأمین می نماید. مدت زمان لازم برای نوزادها به منظور شروع مصرف غذای خارجی در گونه های مختلف ماهی ها متفاوت می باشد و بستگی به اندازه کیسه غذایی دارد (Woyanarovich et al., 1980).

پرورش نوزاد ماهی: لاروهای تفریخ شده قادر به شنا نمی باشند، از ظرفها یا طشتکها به داخل زوک پرورش لارو که بزرگتر است، منتقل می شوند. در پرورش تجارتی نوزادها می توان از دستگاه های نوع قیفی شکل استفاده نمود. این دستگاهها از فایبر گلاس یا پلاستیک توأم با پارچه توری ساخته می شوند (فریدپاک، ۱۳۸۷). نیم میلیون لارو را می توان در درون یک ظرف ۲۰۰ لیتری منتقل نمود. در این ظروف اکثر لاروها به تدریج شنای عمودی خود را به طرف سطح آب انجام می دهند جاییکه حلقه توری نصب شده است. لارو در درون آن باقی مانده و از طریق جریان آب بالا آمده و به کف برگشت می نمایند (هوروات، ۱۳۸۱). این الگوی رفتاری، معمولی ترین الگوی نوزاد ماهی های خانواده کپورماهیان است. در طول این دوره، کار پرورش دهنده تنظیم جریان آب و تمیز کردن مداوم چشمه تور است. پس از مدت کوتاهی شنا نمودن، برخی از نوزادها به وسیله ماده چسبنده مترشحه به وسیله غده ای واقع در انتهای سر، خود را به اجسام می چسبانند (فریدپاک، ۱۳۸۷).

در کپورماهیان لارو تفریخ شده پس از ۳ یا ۴ روز در آب با دمای ۲۴ درجه سانتیگراد، قادر به شنا کردن می باشد. شنا کردن آنها زمانی میسر است که کیسه های شنای خود را با هوا پر کرده باشند. در همین زمان سیستم گوارشی شان قادر به هضم و جذب غذای خارجی است. این دوره نشانه پایان مرحله تفریخ می باشد.

پرورش بچه ماهی نارس: تبدیل نوزاد به بچه ماهی نارس، بزرگترین تغییر در زندگی ماهی می باشد. با پر شدن کیسه شنای نوزاد با هوا، که بچه ماهی را قادر به شنا می نماید و قادر به تغذیه خارجی می شود، مرحله نوزادی خاتمه یافته و مرحله بچه ماهی نارس شروع می گردد. بچه ماهی نارس دارای قسمتی از کیسه زرده می باشد که برای یک تا چهار روز تأمین غذای ماهی را می نماید، این وضع، زمان لازم را در اختیار نوزاد قرار می دهد تا نحوه پیدا کردن غذای طبیعی را فرا گیرد (فریدپاک، ۱۳۸۷). تکامل و پرورش لارو به تغذیه افتاده، در محیط استخر مطمئن تر است. همزمان با جذب کیسه زرده و شروع تغذیه فعال، استخرهای بچه ماهیان نارس برای رها سازی لاروها آماده می شوند. رها سازی آنها زمانی است که آنها تغذیه اولیه خود را در تفریخگاه انجام داده باشند (هوروات، ۱۳۸۱).

بچه ماهی انگشت قد: زمانی که بچه ماهی های نارس به سن ۳ تا ۴ هفته ای می رسند، غذا و عادات تغذیه آنها عوض می شود، و در این مرحله تبدیل به بچه ماهی انگشت قد می گردند. بچه ماهی انگشت قد از لحاظ نوع غذا و عادات تغذیه ای به تدریج به سمت ماهی های بالغ تمایل پیدا می کند (Bardach et al., 1972).

پس از این مرحله بچه ماهیان انگشت قد به اندازه بازاری می رسند که در استخرهای پرورشی مناسب و آماده سازی شده باید صورت گیرد.

۱-۴-۳ اختلالات تولید مثلی ماهیان پرورشی

بیشتر اختلالات ماهیان پرورشی ناشی از استرس و فقدان شرایط محیطی طبیعی مناسب جهت تخم گذاری می باشد (Ohta et al., 1997). اختلالات تولید مثلی عمدتاً در ماهیان ماده دیده می شود که می توان آنها را به سه دسته تقسیم بندی نمود:

اولین و مهمترین مشکل تولید مثلی، ناتوانی کامل ماهی ماده جهت ادامه ویتلوژنز پس از قرار گیری در شرایط پرورشی می باشد. در بسیاری از گونه ها، بچه ماهیان شکار و پرورش داده می شوند. پس از گذشت چند سال از شکار، این ماهیان مرحله ویتلوژنز را آغاز می کنند ولی تنها درصد کمی از این ماهیان اووسیت های مناسب ایجاد می کنند و اغلب اووسیت های آنان کاملاً نارس است و نمی توان حتی با استفاده از درمان هورمونی، تخم ریزی را در آنها القاء نمود. بنابراین در این ماهیان فولیکول ها آترزی شده و در پایان فصل تخم گذاری، جذب می شوند (Monbrison et al., 1997). در مورد ماهی بنی که در این تحقیق تکثیر مصنوعی آن با استفاده از هورمون جدید گرلین انجام می شود، گزارشی وجود دارد که طبق داده ها گونه پرورشی پس از سه سال قادر به باروری نیست و تخمدان ها غیر فعال می شوند و با درمان هورمونی فعال نمی شوند، لذا اختلالات این گونه در این دسته قرار می گیرد.

دومین نوع اختلالات تولید مثلی در ماهیان مولد ماده، عدم بلوغ نهایی اووسیت (FOM) می باشد. به نظر می رسد در این دسته ماهیان ویتلوژنز به صورت طبیعی انجام می گیرد اما در شروع فصل تخم ریزی، اووسیت هایی که ویتلوژنز را طی کرده اند قادر به رسیدن به بلوغ نهایی و در نتیجه تخم گذاری نبوده و آترزی می شوند (Monbrison et al., 1997).

نوع سوم اختلالات تولید مثلی موجود در ماهیان پرورشی عدم تخم ریزی ماهی در انتهای چرخه تولید مثلی می باشد. در این گونه ماهیان، اووسیت ها ویتلوژنز، FOM و تخم گذاری را به طور طبیعی طی می کنند، اما در نهایت ماهی قادر به آزادسازی تخم ها در آب نمی باشد. در برخی گونه ها تخم ها در محوطه شکمی باقی مانده و پس از گذشت ماهها جذب بدن می شوند. در این گونه ماهیان تخم ها باید به صورت دستی خارج شده و به طور مصنوعی تلقیح شوند (Zohar, 1996, 2001). و این کار باید در فاصله زمانی مناسبی پس از تخمک گذاری صورت گیرد، زیرا با طولانی شدن زمان تخمک گیری، تخم ها بیش از حد رسیده شده و تلقیح نخواهند شد (Zohar, 1996, 2001).

۱-۴-۴ کاربرد هورمون های جدید در تکثیر مصنوعی

متأسفانه، بسیاری از ماهیان در شرایط پرورشی دچار اختلالات تولید مثلی می گردند. در این شرایط غالباً بلوغ نهایی اووسیت (FOM) و در نتیجه تخمک گذاری و تخم گذاری در ماهیان ماده اتفاق نمی افتد (Zohar, 1996, 2001). ایجاد تغییر در پارامترهای محیطی مختلف نظیر دما، درجه شوری، عمق، حجم تانک و غالباً می تواند تأثیر مثبتی بر تخم گذاری ماهی داشته باشد (Yaron et al., 1995). با این حال در بسیاری گونه ها، درمان هورمونی تنها راه کنترل تولید مثل ماهی می باشد. اولین روشی که جهت القاء تخم ریزی در ماهیان مولد مورد استفاده قرار گرفت تزریق عصاره غده هیپوفیز در ماهیان بالغ به صورت خام بود (Zohar, 1996, 2001). و پس از آن هورمون های سنتتیک مختلفی بسته به نوع گونه مورد تکثیر استفاده شد که در برخی موارد نتایج خوبی به دست آمد.

در نتیجه مطالعات روی گرلین ثابت شده است که در بسیاری از اعمال فیزیولوژی در جانوران نقش تنظیمی دارد. بر اساس اطلاعات بدست آمده تا به امروز، این روشن است که گرلین بطور مستقیم در سطح هیپوفیز برای تنظیم رهایی LH و GH عمل کرده، لذا به طور غیر مستقیم نوترینت های

ضروری و انرژی لازم برای تسهیل رشد و تولیدمثل را فراهم می کند و این نقشها سبب ایجاد یک نظریه به نام *hypophysiotropic orexigen* شده است که اعمال اصلی بیولوژیکی گرلین در ماهی طلایی را نمایش می دهد (Unniappan et al., 2004). در جمع گرلین در تنظیم دریافت انرژی، رشد و تولیدمثل نقش دارد لذا بطور اساسی بعنوان ماده اشتهاآور تحریکی هیپوفیز با اعمال فیزیولوژیکی متعدد در ماهی می باشد و انجام مطالعات بیشتر و گسترده تر در گونه های دیگر می تواند کمک به روشن نمودن خصوصیات جدیدی از گرلین کند و کاربرد آن را در پرورش ماهی، افزایش رشد و تولیدمثل ماهی مشخص کند (Unniappan, et al., 2005).

۵-۱ رده بندی و خصوصیات نژادی ماهی بنی

۱-۵-۱ ماهی بنی

گونه مورد بررسی *Barbus sharpeyi* نام دارد و از گونه های مهم باربوس ماهیان می باشد و در زبان محلی بنی (benni in Persian, bunnei in Arabic) نامیده می شود (Alhakim et al., 1980).

بر اساس رده بندی جدید، طبقه بندی ماهی بنی به شرح زیر می باشد: (جدول ۱-۲)

شاخه طنابداران (Chordata): دارای لوله عصبی، طناب پشتی، تقارن جانبی و دو طرفی بدن می باشند (Hickman, 1978).

زیر شاخه مهره داران: این زیر شاخه شامل دو فوق رده دهان گردان و آرواره داران است و با صفاتی چون داشتن جمجمه، مغز، ستون مهره و گردش خون بسته، مشخص می شوند (دویلر، ۱۳۷۶).

دسته ماهیان: طبق گزارشات اخیر ۳۱۹۰۰ گونه ماهی توصیف شده است که بیشترین تنوع گونه در میان مهره داران را دارد. اعضاء این گروه دارای باله ها و آبششهای زوج بوده و پوست آنها پولک دار می باشد (حبیبی، ۱۳۶۹).

رده ماهیان استخوانی (Osteichthyes): این رده اکثرا دارای اسکلت استخوانی، پولک های پوستی، آبشش و باله بوده و در مجموع دارای چهار زیر رده است (دویلر، ۱۳۷۶).

راسته کپورماهی شکلان: راسته بسیار وسیعی هستند که با داشتن دستگاه وبر از راسته های دیگر تمیز داده می شوند. این دستگاه زنجیره ای از استخوانهای کوچک است که کیسه شنا را به اندام شنوایی متصل می کند. این استخوانها به علت کوچک بودن به راحتی جابه جا شده، صدا را منتقل کرده و به این ترتیب قدرت شنوایی فوق العاده زیادی را به ماهی می دهند (وثوقی، ۱۳۸۵). بسیاری از ماهیان باارزش اقتصادی در این راسته قرار دارند (نیکبخت، ۱۳۷۶).

خانواده کپورماهیان: این خانواده بزرگترین خانواده ماهیان استخوانی را تشکیل داده و دارای بیشترین پراکندگی در جهان می باشد. این ماهیان معمولا دارای خصوصیات ظاهری مشخصی می باشند. فک های آنها فاقد دندان بوده و مواد غذایی قبل از آنکه وارد روده شوند توسط دندانهای حلقی خرد می شود. این دندانها بر روی پنجمین کمان آبششی قرار دارند (Coad, 2002). ابتدای روده متسع شده و غذا در آنجا انبار می شود. اکثر گونه های این ماهیان بااستثنای برخی از آنها دارای سیبلیک می باشند (نجف پور، ۱۳۷۵).

بدن ماهی عمدتاً از فلس‌های کروی پوشیده شده و کمتر برهنه است، اما سر فاقد فلس می‌باشد. در این خانواده کیسه شنا معمولاً آزاد بوده و توسط یک مجرای باریک با بخش قدامی روده در ارتباط است (Stoskopf et al., 1993). در دوران تولیدمثل و به هنگام جفت‌گیری و تخم‌ریزی به خصوص در ماهیان نر و گاهی ماهیان ماده، دانه‌های مروری‌شکل بر روی پوست سر و بدن ظاهر می‌گردد (وثوقی، ۱۳۸۵). خانواده کپورماهیان با بیش از ۳۴۰ جنس و دو هزار گونه، بزرگترین خانواده ماهیان استخوانی را تشکیل داده و بیشترین پراکندگی را دارند و تقریباً در تمام کره زمین یافت می‌شوند (Yaron et al., 1995).

در کشور ما نیز این خانواده با داشتن ۳۱ جنس و ۷۴ گونه که در تمام حوضه‌های آبریز گسترش یافته اند فون غالب ماهیان را تشکیل می‌دهند. در این میان حوضه آبریز دجله که شامل مناطق غرب و جنوب غربی ایران است با داشتن ۳۱ گونه از این خانواده بیشترین تنوع گونه‌ای را دارا است (Coad و عبدلی، ۱۳۷۵).

در این خانواده حدود ۳۵۰ گونه باربوس در جهان شناخته شده است که تعداد محدودی از آنها دارای ارزش اقتصادی و شیلاتی هستند (Almukhtar et al., 2006).

ماهی بنی *Barbus sharpeyi*:

مورفولوژی: این ماهی سبیلک ندارد و آخرین شعاع باله شکمی تقریباً استخوانی شده است اما فاقد دندان‌های روی شعاع سخت است. تعداد فلس‌های خط جانبی ۳۰ یا ۳۱ است (شکل ۱-۹). تعداد خارهای آبششی ۱۶ یا ۱۸ است. فرمول دندان حلقی ۵، ۳، ۲-۲، ۳، ۵ است و تعداد کل مهره‌ها ۳۷ عدد است. دو شکلی جنسی دیده نشده است. رنگ عمومی بدن سبز روشن به سمت نقره‌ای است. فلس‌های پشت بدن کمی تیره‌اند. صفاق مشکی است. در حالت بلوغ طول کل بدن به ۵۵ سانتی‌متر و وزن آن به ۴ کیلوگرم می‌رسد گونه‌های بومی خوزستان به ۳/۵ کیلوگرم می‌رسند (Alhakim et al., 1980).



شکل ۱-۹ خصوصیات مورفولوژیک ماهی بنی

اهمیت اقتصادی: این گونه بعنوان خوشمزه‌ترین ماهی در دسترس از باتلاق‌های عراق مشخص شده است (Young et al., 1976) و Petr در ۱۹۸۷ در عراق صیدی حدود ۴۲۴۳ تن در سال گزارش نموده است (Alhakim et al., 1980).

سیستماتیک: این گونه اولین بار در عراق کشف شد. سه سین تایپ آن در موزه تاریخ طبیعت لندن هستند. جدول زیر رده بندی جدید این گونه را نشان می دهد (Cuvier & Cloquet, 1816).

جدول ۱-۳ رده بندی ماهی *Barbus sharpeyi*

Taxon	نام لاتین	نام فارسی	رده
Phylum	Chordate	طنابداران	شاخه
Subphylum	Vertebrata	مهره داران	زیر شاخه
Super class	Gnatostomata	آرواره داران	فوق رده
Grade	Pisces	ماهیان	دسته
Class	Osteichthyes	ماهیان استخوانی	رده
Sub class	Actinoptergii	ماهیان شعاع باله	زیر رده
Infra class	Neoptergii	نئوپترجی	تحت زیر رده
Group	Teleostei	ماهیان استخوانی حقیقی	گروه
Super order	Ostariophysi	استاریوفیزی	فوق راسته
Order	Cypriniformes	کپورماهی شکلان	راسته
Superfamily	Cyprinioidea	سیپرینوئیده	بالا خانواده
Family	Cyprinidae	کپورماهیان	خانواده
Subfamily	Cyprininae	سیپرینینا	زیر خانواده
Genus	Barbus	باربوس	جنس
Species	Barbus sharpeyi	بنی	گونه

زیستگاه و پراکنش: گونه ذکر شده، بومی منطقه بین النهرین است و در رودخانه های دجله-فرات در منطقه ایرانی تالاب هورالعظیم و شادگان و رودخانه های حوزه شمالی خلیج فارس مانند رودخانه زهره، کارون، کرخه و بهمنشیر یافت شده است (شهیدی، ۱۳۷۹). برخی حرکت های گونه از دریاچه ها و مارشها در اواخر فوریه و اوایل مارس به رودخانه های محدوده دجله و فرات (محدوده عراق) برای مدت ۳ هفته می باشد. در اواسط ماه اسفند تا اواسط فروردین یک بازگشت به دریاچه ها و باتلاقها برای تخم گذاری وجود دارد. اگر چه در اغلب سال بیشترین ماهی باقیمانده در باتلاقها و دریاچه ها در آبهای آزاد بوده است، اما سطوح پایین آب و دمای بالای آن ممکن است سبب مهاجرت به مناطق عمیق تر یا داخل بخشهای پایین تر رودخانه های دائمی اصلی شود (خلیلی، ۱۳۸۷). این گونه نسبت به گونه *B. xanthopterus* به سطوح پایین اکسیژن حساس تر است (Alhakim et al., 1980). مرمضی در

سال ۱۹۹۴ گزارش نمود این گونه استنوهالین است چنانچه پراکنش آن محدود شده است. اثرات شوری بر سرعت رشد آن آزمایش شده است.

سن و رشد: در سنین بلوغ ماده ها بلندتر و سنگین تر از نرها هستند. طول عمر ماده ها ۹ سال و نرها ۸ سال است. بلوغ در سال سوم در طول کل ۳۵-۳۲ شروع می شود. بلوغ نرها زودتر از ماده ها است. ماهیهای نر رودخانه دجله در عراق ۲۵ سانتی متر و ماده ها ۲۸ سانتی متر هستند و در سال دوم زندگی بالغ می شوند و تخمیزی را در سال سوم انجام می دهند. نرها بعضی جاها فراوان تر از ماده ها در مناطق تخمیزی هستند. این گونه در عراق در ۴ سالگی بالغ می شود و رشد بهتری دارد. نسبت ماده ها به نرها ۱ به ۳ است (Alhakim et al., 1980).

غذا: این گونه گیاهخوار است و از کلروфіسه، دیاتومه و جلبک های رشته ای در سنین پایین و گیاهان درشت تر و دتریتها در سنین بالاتر تغذیه می کند. Nasir و Epler در سال ۱۹۸۹ تأیید کردند که این گونه کاملاً گیاهخوار است اگر چه گاهی پاروپاها و نرم تنان را می گیرد اما اغلب جلبکها و دیاتومه ها و دتریتها را می خورد (حمیدیان، ۱۳۸۱).

بیولوژی تولید مثل: قبل از خشکسالی زمینهای باتلاقی، این گونه بالاترین میزان تولید مثل را در میان ماهیان صید شده در شیلات عراق داشت (در حدود ۵۰۰۰ تن) که این مقدار ۱/۴ صید ماهیان آب شیرین منطقه می باشد. این گونه پس از خشکسالی در خلال سالهای ۲۰۰۳-۱۹۹۱ به عنوان گونه در خطر مناطقی از عراق شناخته شد. در سال ۲۰۰۳ در خلال برنامه احیاء و بازسازی زمینهای باتلاقی عراق تصمیم بر این شده که توسط افزایش در تخمیزی این ماهی جهت طبیعی آنها افزایش داده شود و برای کسب تخمیزی موفقیت آمیز این گونه، توصیه شده است که مطالعاتی در زمینه بیولوژی تولید مثل بنی انجام پذیرد (Almukhtar et al., 2006).

تخمیزی اساساً در دریاچه ها و باتلاقها رخ داده و بیشتر در مناطق پایین دست اتفاق می افتد. ماهیها در هنگام غروب در مناطق تخمیزی ظاهر می شوند و آنجا تا قبل از تاریکی هوا می مانند و صبح زود بر می گردند و نزدیک ساعت ۸ صبح بر می گردند. تخم ها در زیر آب روی گیاهان در یک متری زیر آب قرار داده می شوند. تخم ها بزرگ و زرد و قطر ۱/۷ میلی متر به تعداد ۱۵۸۰۰۰ هستند. همواری نسبی ۱۰۰۲۱ تا ۲۸۴۷۱ تخم برای ماهیهای ۴-۶ ساله در دریاچه های عراق در ماه آوریل آبهای شیرین و فوریه-مارس دریاچه های شور می باشد. این ماهیها یکدیگر را دنبال می کنند، تکی یا جفت پرت می شوند و گاه به سطح آب می آیند و آب پاشی می کنند. مهاجرت تخمیزی توسط نرها در ماه اکتبر و دسامبر هدایت شده و در ماه فوریه توسط ماده ها به سرعت افزایش می یابد. نرها در آوریل ناپدید می شوند (Alhakim et al., 1980).

۱-۶ مطالعات انجام شده

تحقیقات انجام شده در مورد هورمون گرلین و برخی آثار فیزیولوژیک آن عمدتاً در کانادا، امریکا، ژاپن و لهستان انجام شده است. پس از کشف این هورمون در دسامبر ۱۹۹۹ توسط Kojima و همکاران از معده موش صحرایی، (علیجانی، ۱۳۸۵) در سال ۲۰۰۳ Richard Peter و همکارش در دانشگاه آلبرتا کانادا اثرات In vivo و In vitro گرلین را بر میزان هورمون رشد و هورمون LH در ماهی حوض مطالعه نمودند و اثر تحریکی این هورمون مشخص گردید (Unniappan et al., 2004). در سال ۲۰۰۵، ساختار ژن و عملکرد فیزیولوژیک گرلین را در ماهی طلاپی، نیلاپی، قزل

آلا و مارماهی بررسی شد و مشاهده شد تزریق گرلین میزان LH را چند دقیقه پس از تزریق افزایش می دهد (Unniappan et al., 2005).

در سال ۲۰۰۶ در مجارستان توسط Kotunia و Zabielski گرلین استخراج شده و اثرات تکوینی آن در نوزاد جانوران اهلی مطالعه شد. طبق این مطالعه پروگرلین یک پروهورمون است که پس از پروتئین سازی تغییر می کند و گرلین و ابستاتین از آن مشتق می شود؛ این دو پپتید از لحاظ ساختاری و عملکرد هورمونی و گوارشی با هم متفاوت هستند (Kotunia et al., 2006).

در امریکا در سال ۲۰۰۶ نیکولاس و همکارانش اثرات کلینیکی و فیزیولوژیک گرلین را بررسی نمودند و گزارش کردند که کاهش گرلین سبب اثر منفی بر عملکرد غدد تیروئید و جنسی نر و ماده می شود و ارتباط مستقیمی با گرسنگی دارد (Tritas et al., 2006)؛ در همین سال Yada و همکارانش در ژاپن گزارش نمودند گرلین سبب تحریک عمل فاگوسیتوز در لوکوسیت های ماهی می شود لذا بر سیستم دفاعی ماهی مؤثر است (Yada et al., 2006).

تحقیقات در ایران در زمینه اثرات گرلین توسط خزعلی در دانشگاه شهید بهشتی برای اندازه گیری هورمونهای تیروئیدی و FSH و LH و میزان تولید شیر در سال ۱۳۸۵ در بزهای نژاد سانن انجام شده است. گرلین سبب کاهش LH و T3 و T4 شده اما تولید شیر را افزایش داد (علیجانی، ۱۳۸۵).

با توجه به سوابق فوق، اثر گرلین در ایران بر روی ماهیان مطالعه نشده است و در مطالعات جهانی گونه های آبهای داخلی ایران از لحاظ تأثیر عملکردی گرلین معرفی نشده اند. تحقیق حاضر سعی دارد این کمبود را بر طرف نماید.

در زمینه ماهی بنی در ایران در سال ۱۳۷۳ ولی نژاد، پاپهن و حقوقی راد در مورد انگل های مونوژن این ماهیان در رودخانه کارون مطالعه انجام دادند (ولی نژاد، ۱۳۷۳). در سال ۱۳۷۹ پیغان و شهیدی خصوصیات آناتومیک و مورفومتریک این گونه را تعیین نمودند (شهیدی، ۱۳۷۹). در سال ۱۳۸۱ آلبوغیش و حمیدیان ساختار بافت شناسی و هیستومتریک پوست نواحی مختلف بنی را مطالعه کردند (حمیدیان، ۱۳۸۱). نیک پی در سال ۱۹۹۴ دریافت ماهی بنی در خلال ماههای اسفند تا فروردین در انشعابات از رودخانه کرخه تخم گذاری می کند (نیک بخت، ۱۳۸۶). مرمضی و المختار در سال ۲۰۰۰ دریافتند که تخم ریزی ماهی بنی در تالاب شادگان در خلال ماه اسفند می باشد و در مطالعه ای دیگر در همین سال گزارش نمودند ماهی بنی بالاترین درصد ماهیان در تالاب شادگان را دارد (Almuhktar et al., 2006).

سایر کارهای انجام شده در خارج از ایران در ماهی بنی توسط الحامد در ۱۹۶۶ و الحیران در ۱۹۷۴ در زمینه سن و رشد ماهی، الحامد در ۱۹۷۲ بر قابلیت باروری گونه در تالاب سینا کشور عراق، الحکیم در سال ۱۹۷۶ در مورد موفولوژی و اندازه اولین بلوغ ماهی بوده است. همچنین یاسر در سال ۱۹۸۸ رابطه میان ترکیبات بدن و بیوشیمی گندهای بنی را با بررسی مرحله بلوغ ماهی بدست آورد. جاسم در ۱۹۸۸ بیولوژی عمومی بنی را در تالاب الحامر عراق مطالعه نمود و در سال ۲۰۰۶ همراه با المختار بیولوژی عمومی تولیدمثل همین گونه را در هورالعظیم مطالعه نمودند (Almuhktar et al., 2006).

تکثیر مصنوعی گونه مذکور با غده هیپوفیز سالهاست که توسط اداره کل شیلات خوزستان انجام می شود در زمینه تکثیر مصنوعی گونه مورد نظر با هورمون های جدید تحقیق و بررسی کم انجام شده است لذا تحقیق حاضر تلاش دارد این خلأ را در حد توان پر نماید.

با توجه به نقش تحریکی هورمون گرلین در دستگاه تولید مثلی ماهیان، و از طرفی خلأ مطالعاتی بر روی هورمون های سنتتیک و جدید در امر تکثیر ماهی بنی، در این تحقیق سعی شده است علاوه بر بررسی های بافتی و خونی هورمون گرلین بر روی ماهی گونه *Barbus sharpeyi*، میزان موفقیت هورمون گرلین در تکثیر مصنوعی این گونه اقتصادی مطالعه و با میزان موفقیت عصاره غده هیپوفیز، مقایسه شود.



فصل دوم

مواد و روشها



۲-۱ مواد مورد استفاده

۲-۱-۱: ماهیان مورد آزمایش

تعداد ۵۶ ماهی ماده گونه *Barbus sharpeyi* در اواخر فروردین ماه سال ۱۳۸۸ در دو نوبت از استخرهای پرورشی مرکز تکثیر وابسته به اداره شیلات خوزستان توسط تورهای انتظاری صید شد و به استخرهای سرامیکی واقع در سالن تکثیر انتقال داده شد.

۲-۱-۲ مواد مصرفی تزریق و تکثیر ماهیان

پودر کریستاله گرلین (خلوص ۹۵٪)، غده هیپوفیز فراوری شده ماهی، سرم نمکی قابل تزریق، عصاره میخک، تانن

۳-۱-۳ مواد مصرفی آماده سازی نمونه های بافتی

فرمالین، اسید پیکریک، الکل اتیلیک مطلق سفید؛ گزیل و پارافین مرک؛ همتوکسیلین کریستال، الکل مطلق، آلوم آلومینیوم یا پتاسیم، اکسید مرکوریک، اسید استیک گلاسیال؛ ائوزین؛ اسید پریودیک، اسید نیتریک، فوشین بازی، سدیم متابی سولفیت؛ اسید کلریدریک؛ پودر کربنات لیتیم؛ چسب انتلان، گلیسرین

۲-۲ وسایل و دستگاههای مورد استفاده

۲-۲-۱ وسایل و دستگاههای تکثیر ماهیان

استخرهای سرامیکی با حجم ۱۰۰۰ لیتر، ویس، زوک، وان پلاستیکی با حجم ۳۰۰ لیتر با سیستم هوادهی؛ ظروف پلاستیکی کوچک؛ ظرفهای پتری و لام میکروسکوپی؛ استریومیکروسکوپ؛ تخته بیومتری؛ ترازوی دیجیتالی (دقت ۰/۰۰۱)؛ پلاک آلومینیومی؛ سرنگ انسولین (شکل ۲-۱ تا ۲-۴)



شکل ۲-۲ استخر سرامیکی و وان



شکل ۲-۱ انکوباتورهای ویس و زوک پلاستیکی



شکل ۲-۴ ترازوی دیجیتال



شکل ۲-۳ پلاکهای آلومینیومی

۲-۲-۲ مواد مصرفی، وسایل و دستگاه های خونگیری

سرنگ ۵ و ۲ میلی لیتری؛ ظرف درب دار نمونه خونی هماتوکریت؛ لوله آزمایش سانتریفوژ؛ دستگاه سانتریفوژ؛ یخچال و فریزر؛ گاما کانتر LKB؛ آنتی بادی منوکلونال و آنتی بادی ضد GTH-II؛ کیت Immunotec (شکل ۲-۵ و ۲-۶).



شکل ۲-۶ دستگاه سانتریفوژ



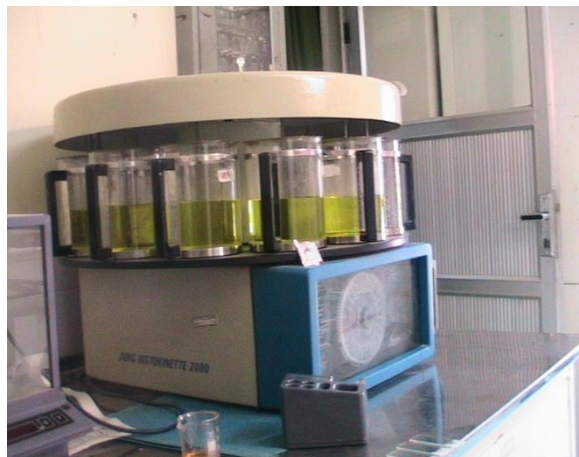
شکل ۲-۵ ظروف هماتوکریت

۲-۲-۳ دستگاههای آماده سازی نمونه های بافتی

اتوتکنیکون (هیستوکینت)؛ اتوکلاو؛ میکروتوم؛ دستگاه تیز کننده تیغه میکروتوم؛ بن ماری؛ فوتو میکروسکوپ؛ لنز چشمی مدرج و اسلاید کالیبره (شکل ۲-۷ و ۲-۸)



شکل ۲-۸ دستگاه میکروتوم



شکل ۲-۷ دستگاه هیستوکینت

۲-۳ روش کار

۲-۳-۱ نمونه برداری

آزمایشات تزریق و نمونه برداری در مرکز تحقیقات ماهیان بومی دشت سوسنگرد در ۴۵ کیلومتری غرب اهواز انجام گردید. برای اجراء در اواخر فروردین ماه سال ۱۳۸۸، در تکرار اول ۵۶ ماهی ماده از گونه *Brabus sharpeyi* و در تکرار دوم ۵۶ قطعه دیگر از استخرهای خاکی صید (شکل ۲-۹) و به کارگاه انتقال داده شدند (شکل ۲-۱۰)؛ طول و وزن کل اندازه گیری شد، ماهیان در محدوده وزنی ۱۲۵۰-۵۰۰ گرم قرار داشتند: طول کل آنها ۴۰-۳۰ سانتی متر بود و از لحاظ سنی همگی ۳ ساله و از لحاظ جنسی بالغ بودند.



شکل ۲-۱۰ انتقال ماهی زنده به کارگاه



شکل ۲-۹ عملیات صید از استخرهای خاکی

پس از زیست سنجی ماهیان به استخرهای سرامیکی با گنجایش ۱۰۰۰ لیتر انتقال داده شدند؛ منبع تغذیه آب استخرها، از آب رودخانه کرخه با pH حدود ۷/۷ بوده، آب در حال جریان و دمای آن حدود ۲۲ °C بود. ماهیان در استخرهای سرامیکی به منظور کاهش استرس تغذیه نشدند.

۲-۳-۲ عملیات پلاک گذاری و تزریق

در هر تکرار، ۵۶ قطعه ماهی به ۵ تیمار شم زمان صفر، شم ۲۴ ساعته، تیمار ۱ گرلین و تیمار ۲ گرلین و تیمار هیپوفیز به عنوان شاهد مثبت تقسیم شدند.

تیمارها: به منظور مطالعه خونی (n=16): چهار تیمار شم زمان صفر (n=4)، تیمار ۱ (n=4) و ۲ (n=4) گرلین و تیمار هیپوفیز (n=4) در نظر گرفته شده است و به منظور مطالعه بافتی (n=20): و بازماندگی تخم و لارو (n=20): پنج تیمار شم زمان صفر (n=4) و ۲۴ ساعته (n=4)، تیمار ۱ (n=4) و ۲ (n=4) گرلین و تیمار هیپوفیز (n=4) تعیین شد.

تکرارها: به منظور تأیید نتایج، هر سه بخش مطالعات با دو تکرار در هر تیمار انجام شد.

به منظور نشانه گذاری ماهیان، آنها را از استخرهای سرامیکی در آب حاوی میخک رها کرده و پس از بیهوشی آنها، پلاکهای آلومینیومی به باله پشتی آنها وصل گردید (شکل ۲-۱۱).



شکل ۲-۱۱ پلاک گذاری ماهیان

تزریق به صورت درون صفاقی (IP) به کمک سرنگ انسولین انجام شد. به منظور تزریق دو مرحله ای از پودر کریستاله گرلین در یک ویال ۱/۵ سی سی محلول استوک تهیه شد و محلولهای ۱۰٪ و ۹۰٪ تیمارهای یک و دو تهیه شدند. محلولهای تزریق دو مرحله ای هیپوفیز جداگانه تهیه شد.

در تزریق مرحله اول پس از بیهوشی ماهیان در محلول عصاره میخک؛ تیمارها به ترتیب زیر تعیین شدند:

۱ و ۲. تیمارهای شم ۱۰۰ ng/g وزن بدن سرم فیزیولوژی؛

۳. تیمار یک گرلین ۱۰۰ ng/g وزن بدن محلول ۱۰٪؛

۴. تیمار دو گرلین ۱۵۰ ng/g وزن بدن محلول ۱۰٪ و

۵. تیمار هیپوفیز ۴ mg/g وزن بدن محلول ۱۰٪ غده هیپوفیز دریافت نمودند.

هر ماهی پس از دریافت دوز مربوطه بر اساس وزن بدن در استخر سرامیکی دیگری با آب تازه رها شده و هوشیاری مجدد می یابد.

۱۲ ساعت بعد، تزریق مرحله دوم انجام می شود. ماهیان مجدداً صید و بیهوش شدند. تیمارهای شم زمان صفر و ۲۴ ساعته، تیمار یک و دو و تیمار غده هیپوفیز محلولهای ۹۰٪ مربوطه را به صورت درون صفاقی دریافت نمودند.

۳-۳-۲ جداسازی ماهیان برای مطالعه

پس از تزریق نهایی به منظور مطالعه خونی، از هر تیمار ۴ ماهی، در وان های بزرگ حاوی آب جاری رها می شود.

بقیه ماهیان ۱۲ ساعت بعد به منظور مطالعه بافتی و تخم کشی، در استخر سرامیکی رها می شوند.

۴-۳-۲ مطالعه هورمونی

در زمان های ۱۲۰، ۹۰، ۶۰، ۳۰ دقیقه پس از تزریق ماهیان بیهوش شده و از سیاهرگ دمی خونگیری انجام می شود. نمونه های خون در لوله های سانتریفوژ به منظور لخته شدن برای چند ساعت در دمای یخچال (۴ درجه سانتیگراد) نگهداری شده سپس با دور ۸۰۰۰ در ۵ دقیقه در دستگاه سانتریفوژ سرم آنها جداسازی می شود (شکل ۲-۱۲).



شکل ۲-۱۲ سانتریفوژ نمونه های خون

به منظور اندازه گیری GTH-II نمونه های سرم در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

اندازه گیری هورمون مربوطه با تکنیک رادیو ایمنو اسی RIA بر اساس واکنش رادیو ایمنو متریک ساندویچی غیر رقابتی استوار شده است. نمونه های سرمی همراه با آنتی بادی ضد این هورمون که با ید رادیواکتیو ۱۲۵ نشاندار شده است را درون لوله های پوشش داده شده با آنتی بادی منوکلونال به مدت ۲ ساعت انکوبه کرده و پس از این مدت لوله ها شسته شده و با گاما کانتر LKB ساخت کشور فنلاند پرتو دهی حاصل از اتصال ($Ab^* + Ag + Ab$) اندازه گیری و پردازش می

شود. جهت کالیبراسیون و اندازه گیری این هورمون از کیت Immunotech ساخت فرانسه استفاده شده است (شکل ۲-۱۳).



شکل ۲-۱۳ عکس و مدل دستگاه گاما کانتر LKB / Wallac Model 127 Gamma Counter with conveyor extension

۲-۳-۵ مطالعه بافتی

۱۲ ساعت بعد از تزریق مرحله دوم، ماهیان هر گروه از لحاظ بافت تخمدان بررسی شدند. به منظور مطالعات میکروسکوپی پس از بیهوشی آنها، حفره شکمی نمونه ها باز شده و پس از بررسی شکل و رنگ تخمدان، ابعاد و وزن دو تخمدان ثبت گردید (شکل ۲-۱۴).



شکل ۲-۱۴ بررسی شکل و رنگ تخمدان ماهی بنی

جهت تهیه مقاطع میکروسکوپی از نمونه های مورد مطالعه پس از ثبوت، مراحل شستشوی بافت صورت گرفته و با استفاده از دستگاه هیستوکینت، مراحل مختلف پاساژ شامل آگیری، شفاف کردن و

آغشتگی با پارافین صورت گرفت. سپس نمونه ها قالب گیری شده و با استفاده از میکروتوم دورانی، برش هایی به ضخامت ۵-۶ میکرومتر تهیه و رنگ آمیزی گردید.

مراحل تهیه مقاطع بافتی به ترتیب ذیل انجام گرفت (نیکبخت و آلبوغبیش، ۱۳۸۶).

۱- ثبوت (Fixation)

پس از جدا کردن گنادها برشهای عرضی به ضخامت متوسط ۵ میلی متر از آنها تهیه شد، برای جلوگیری از عمل اتولیز پس از نمونه برداری، نمونه ها در محلول بوئن حداقل به مدت ۳ روز قرار داده شدند.

محلول بوئن فیکساتوری مناسب برای بافتهای آبزیان است. روش تهیه ۱۰۰ میلی لیتر آن، بدین صورت است: ۷۰ میلی لیتر اسید پیکریک و ۲۵ میلی لیتر فرمالین ۴۰٪ و ۵ میلی لیتر اسید استیک با یکدیگر ترکیب می شوند؛ محلول زرد رنگ بدست آمده محلول فیکساتیو بوئن است.

۲- شستشو با الکل ۵۰ درجه (Washing)

برای اینکار نمونه ها در بسکت مخصوص قرار داده شده و حداقل به مدت ۴ تا ۵ ساعت در الکل ۵۰ درجه شستشو داده می شوند.

۳- آبگیری و شفاف سازی و آغشتگی با پارافین (Dehydration)

تمام مراحل به طریق اتوماتیک در دستگاه هیستوکینت به مدت ۲۱ ساعت انجام می شود. جهت آبگیری از الکل اتیلیک با غلظت های صعودی ۷۹°، ۸۰°، ۹۰° و دو ظرف الکل ۱۰۰ درصد استفاده گردید. عمل شفاف کردن با استفاده از دو ظرف گزیل انجام گردید. سپس نمونه ها در پارافین مایع ۵۸-۵۶ درجه سانتیگراد فرو برده می شوند. در این مرحله پارافین در بافت جایگزین می شود و باعث قوام ساختمان بافت می گردد بطوری که تهیه برشهای ۵ میکرومتری از بافتها به خوبی امکان پذیر می باشد.

۴- قالب گیری در پارافین (Blocking)

بعد از آغشتگی بافتها با پارافین بلافاصله قالب گیری انجام گرفت.

برای اینکار بافتهای آغشته شده با پارافین در قالبهای مخصوص که سطح داخلی آنها با گلیسرین چرب شده و حاوی پارافین مذاب بود، قرار داده شد. قالب حاوی بافت، پس از سرد شدن سفت شده و در حین سرد شدن شماره نمونه بر روی آن قرار داده شد (شکل ۲-۱۵).



شکل ۱۵-۲ قالب گیری نمونه ها

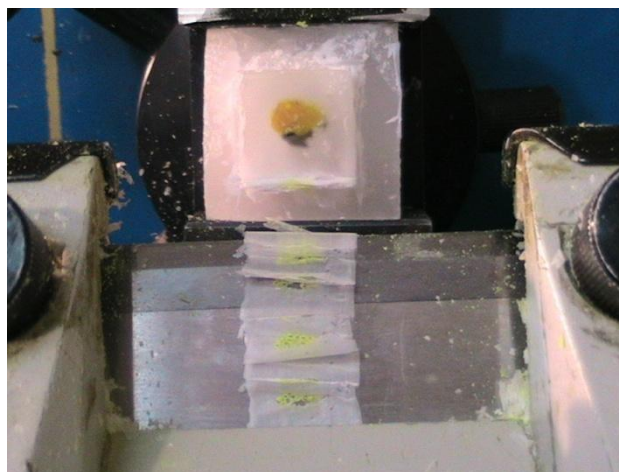
۵. برش گیری (Sectioning) و چسباندن روی لام

قبل از برش گیری، پارافین اضافی اطراف نمونه را به کمک اسکالپل گرم خارج نموده تا آماده برش با میکروتوم شود که اصطلاحاً Trimming نامیده می شود (شکل ۱۶-۲).



شکل ۱۶-۲ بلوک پارافینی اصلاح شده

با استفاده از میکروتوم از نمونه های قالب گیری شده برشهایی به ضخامت ۵-۶ میکرومتر تهیه گردید؛ و سپس برش ها بر روی سطح آب با دمای ۴۸-۵۰ درجه سانتیگراد منتقل نموده تا چین و چروک موجود در نمونه برطرف گردد، برش های مناسب با فرو بردن لامهای آغشته به چسب آلبومین به زیر برشهای صاف شده، برداشت گردیدند و به منظور چسبیدن و ثابت شدن برشها روی لام به مدت چند ساعت در شرایط آزمایشگاه قرار داده شدند (شکل ۱۷-۲).



شکل ۲-۱۷ برش های سریال حاصل از برش گیری

۶. رنگ آمیزی (Staining)

در این مطالعه از رنگ آمیزی روتین هماتوکسیلین – ائوزین (H&E) استفاده گردید.

علاوه بر آن جهت مطالعه دقیق و بررسی ساختار بافتی برخی از قسمت های فولیکولهای تخمدان رنگ آمیزی اختصاصی پریودیک اسید شیف (PAS) استفاده گردید.

رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین

هماتوکسیلین مورد استفاده در این مطالعه از نوع هاریس و ائوزین نوع الکلی بود (پورمهدی بروجنی، ۱۳۷۹).

– محلول هماتوکسیلین آلوم هاریس

۲/۵ گرم هماتوکسیلین را در ۵۰۰ سی سی الکل مطلق حل نموده و سپس ۵۰ گرم آلوم پتاسیم در ۵۰۰ سی سی آب مقطر حل گردید. سپس دو محلول مخلوط شده و مخلوط را حرارت داده می شود تا به نقطه جوش برسد و سپس به آن ۱/۵ گرم اکسید مرکوریک اضافه گردید. پس از سرد شدن به میزان ۲۰ سی سی اسید استیک گلاسیال اضافه شد.

– محلول اسید الکل

۱ سی سی اسید کلریدریک غلیظ و ۹۹ سی سی الکل اتیلیک ۷۰٪ با یکدیگر ترکیب گردید.

– محلول کربنات لیتیم

برای تهیه این محلول، کربنات لیتیم را در یک لیتر آب مقطر، به قدری حل کرده تا محلول به حد اشباع برسد.

- محلول کار ائوزین

۱ گرم ائوزین را در ۲۰ سی سی آب مقطر حل کرده، سپس ۸ سی سی الکل مطلق به آن اضافه گردید و بدین ترتیب محلول یک درصد ذخیره ائوزین تهیه شد. به یک قسمت از محلول تهیه شده سه قسمت الکل اضافه شده، سپس چند قطره اسید استیک گلاسیال اضافه شد. اگر رنگ قرمز پر رنگ احتیاج باشد، به ازاء هر ۱۰۰ سی سی محلول ذخیره ائوزین ۰,۵ سی سی اسید استیک گلاسیال می توان اضافه کرد.

- مراحل رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین (شکل ۲-۱۸)



شکل ۲-۱۸ ظروف مراحل رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین

۱. پارافین گیری

در این مرحله مقاطع بافتی در دوظرف گزیل، هر کدام به مدت ۵ دقیقه قرار داده شدند تا پارافین حل شده و برش آماده آب دهی گردد.

۲. آب دهی

برای این منظور نمونه ها در الکل اتیلیک با غلظت های نزولی ۱۰۰، ۹۰، ۸۰ و ۷۰ درجه به مدت یک دقیقه در هر ظرف قرار داده شدند.

۳. رنگ آمیزی با هماتوکسیلین

پس از آب دهی، مقاطع بافتی به مدت ۵-۱۰ دقیقه در رنگ هماتوکسیلین قرار داده شدند سپس مقاطع با آب جاری شستشو شدند تا زمانی که آب خروجی کاملاً بی رنگ گردید.

۴. اسید الکل و کربنات لیتیم

برش ها برای چند لحظه در محلول اسید الکل قرار داده شدند تا رنگ های غیر ضروری خارج گردید. در موارد ضروری برای تسریع در قلیایی شدن برش ها، از کربنات لیتیم استفاده گردید.

سپس مقاطع بافتی در آب جاری شستشو داده می شوند تا رنگ مقطع دوباره آبی شود (پورمهدی بروجنی، ۱۳۷۹).

۵. رنگ آمیزی با ائوزین

مقاطع بافتی به مدت ۵-۶ دقیقه در محلول ائوزین قرار داده شدند و سپس با آب مقطر شستشو داده شدند.

۶. آبگیری مقاطع

مقاطع بافتی در محلولهای الکلی با غلظت های صعودی ۷۰، ۸۰ و ۹۰ درجه هر کدام به مدت ۲-۱ دقیقه و در دو ظرف ۱۰۰ درجه هر کدام به مدت یک دقیقه قرار داده می شوند تا آب مقطع کاملاً گرفته شود.

۷. شفاف کردن

مقاطع بافتی در دو ظرف گزیل هر کدام به مدت ۵ دقیقه قرار داده شدند تا کاملاً شفاف شوند (نیکبخت و آلبوغبیش، ۱۳۸۶).

۸. چسباندن لامل روی لام

پس از قرار دادن یک قطره از چسب انتلان یا کانادا بالزام بر روی مقطع، لامل با زاویه ۴۵ درجه بر روی لام قرار داده می شو بطوریکه هیچگونه حباب هوایی بین لام و لامل به وجود نیاید.

- رنگ آمیزی پریودیک اسید شیف

این نوع رنگ آمیزی بر مبنای تبدیل عامل الکلی به الدئیدی بوده و در اثر معرف شیف رنگ بنفش را می پذیرد. این روش برای مشخص کردن مواردی نظیر کربوهیدراتها، موسین و گلیکوژن بکار برده می شود (سلامات، ۱۳۸۷).

روش تهیه محلولهای مورد نیاز برای رنگ آمیزی PAS به شرح زیر است (خلیلی، ۱۳۸۷):

یک گرم فوشین بازی را در یک ظرف یک لیتری حاوی ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر در حال جوش، حل کرده و به مدت ۵ دقیقه بهم زده، سپس محلول را به ۵۰ درجه سانتیگراد رسانده و به وسیله صافی فیلتر گردید. به محلول صاف شده ۲۰ میلی لیتر اسید کلریدریک نرمال اضافه گردید و تا ۲۵ درجه سانتیگراد خنک گردیده و به آن یک گرم متابی سولفیت سدیم اضافه گردید و به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در محل تاریک نگهداری شد. سپس ۲ گرم زغال به آن اضافه گردیده و به مدت ۱ دقیقه بهم زده شد. در نهایت محلول را بوسیله صافی فیلتر نموده و در محل تاریک در درجه حرارت ۰-۴ درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

مراحل رنگ آمیزی PAS (شکل ۱۹-۲)



شکل ۱۹-۲ ظروف مراحل رنگآمیزی پریودیگ اسید شیف

۱. پارافین گیری

در این مرحله مقاطع بافتی را در دو ظرف گزیل، هر کدام به مدت ۵ دقیقه قرار دادیم تا پارافین حل و آماده آب دهی گردد.

۲. آب دهی

برای این منظور نمونه ها در الکل اتیلیک با غلظت های نزولی ۱۰۰، ۹۰، ۸۰ و ۷۰ درجه به مدت یک دقیقه قرار داده شدند.

۳. اسید پریودیگ

نمونه ها به مدت ۱۰-۵ دقیقه در محلول یک درصد اسید پریودیگ قرار گرفتند تا اکسیده شوند.

۴. شستشو

با آب جاری به مدت ۱۰-۵ دقیقه و سپس با آب مقطر شستشو داده شدند.

۵. معرف شیف

مقاطع به مدت ۲۰-۱۰ دقیقه در محلول معرف شیف قرار داده که در این مورد تجربه نشان می دهد که چنانچه رنگ تازه باشد زمان ۱۵ دقیقه کافی است در غیر اینصورت زمان افزایش داده می شود.

۶. شستشو

مقاطع با آب جاری به مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده شدند.

۷. متابی سولفیت

مقاطع در محلول سولفیت ۱ و ۲ و ۳ هر کدام به مدت ۱/۵ دقیقه قرار داده می شوند تا موجب تثبیت و خنثی کردن فوشین شود.

۸. شستشو

مقاطع به مدت ۱۰ دقیقه با آب جاری شستشو داده شدند.

۹. رنگ آمیزی افتراقی

بدین منظور نمونه ها به مدت ۵ دقیقه در محلول همتوکسیلین قرار داده شدند و سپس با آب جاری شستشو داده شدند.

۱۰. آبگیری

مقاطع بافتی در محلولهای الکلی با غلظت صعودی ۷۰، ۸۰، ۹۰ درجه و دو ظرف الک ۱۰۰ درجه هر کدام به مدت یک دقیقه قرار گرفتند.

۱۱. شفاف کردن

مقاطع بافتی در دو ظرف گزیل هر کدام به مدت ۵ دقیقه قرار می گیرند تا کاملاً شفاف شوند.

۱۲. مانت کردن

لامل متناسب روی لامها به کمک چسب انتلان قرار داده شدند.

مطالعه میکروسکوپی مقاطع بافتی

۱. مطالعه بافت شناسی تخمدان نمونه ها

در این بخش توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی های $\times 10$ ، $\times 3/2$ و $\times 40$ عدسی شیئی، ساختار بافتی تخمدان تیمارهای ۵۶ ماهی بنی، از لحاظ مراحل اووژنز و ویژگیهای تخمدان، بررسی شد. در صورت مشاهده یک مرحله از اووژنز در هر یک از مقاطع بافتی تخمدان همزمان و در صورت مشاهده چند مرحله اووژنز تخمدان ناهمزمان در نظر گرفته می شود (Donald, 2007). نتایج با استفاده از جداول و تصاویر میکروسکوپی ارائه خواهد شد (شکل ۲-۲۰).



شکل ۲-۲ دستگاه فوتو میکروسکوپ

۲. مطالعه هیستومتریک برش های بافتی تخمدان

پس از مطالعه بافت شناسی برش های تخمدان، مطالعه هیستومتریک ساختار تخمدان به کمک میکروسکوپ نوری و عدسی چشمی مدرج و اسلاید کالیبره انجام شد. این اندازه گیری ها شامل شمارش، درصد گیری و میانگین گیری و در نهایت مقایسه آماری فولیکولهای بالغ و نابالغ در هر یک از گروههای مورد آزمایش، اندازه گیری و میانگین گیری و مقایسه آماری قطر حداقل ۱۰ فولیکول انتخاب شده در چند میدان دید (از هر اسلاید) در کلیه تیمارهای مورد آزمایش می باشد.

- روش اندازه گیری قطر فولیکول

جهت اندازه گیری این مناطق از عدسی چشمی مدرج میکروسکوپ Olympus با تقسیمات مشخص شده استفاده گردید. پس از شمارش تعداد واحدهای عدسی مدرج چشمی، عدد حاصله بسته به درشت نمایی عدسی در ضریب ثابت (اسلاید کالیبره) ضرب می شود که عدد حاصله نشان دهنده اندازه واقعی منطقه مربوطه بر حسب میکرومتر می باشد (جدول ۱-۲).

جدول ۱-۲ مقیاس عدسی مدرج چشمی بر اساس اسلاید کالیبره میکرومتر

طول هر واحد عدسی مدرج چشمی (میکرومتر)	درشت نمایی عدسی شیئی
۴۵	$\times 3/2$
۳۴	$\times 4$
۱۳/۵	$\times 10$
۶/۶۶	$\times 20$
۳/۳۳	$\times 40$
۱/۳۳	$\times 100$

۲-۳-۶ مطالعه هماوری و بازماندگی تخمک و لارو

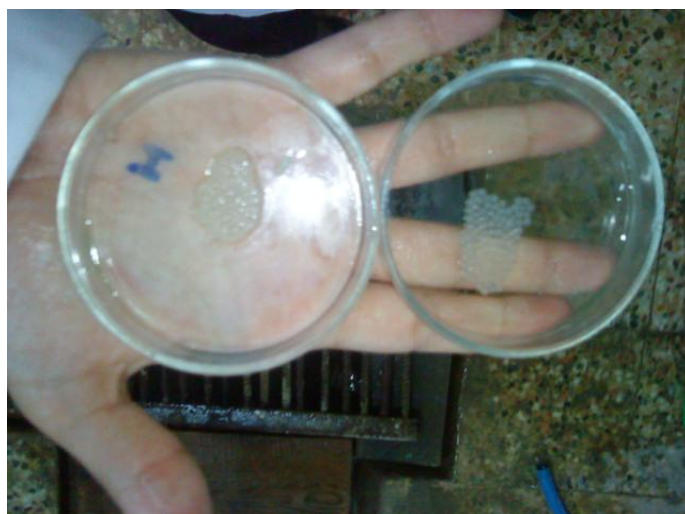
- تخم کشی

ماهیهای باقیمانده در استخر بیهوش شده و عملیات تخم کشی با اعمال فشار بر محوطه شکمی، از هر یک از آنها انجام شد (شکل ۲-۲۱).



شکل ۲-۲۱ تخم کشی

تخمک ها توزین شده ، نمونه ای از آن برداشته (شکل ۲-۲۲)، وزن شده و تعداد تخمک های آن توسط استریو میکروسکوپ شمارش شد.



شکل ۲-۲۲ نمونه ای از تخمک های استحصالی

هماوری کاری مطابق فرمول ۱-۲ بدست می آید:

F= هم آوری

G= وزن تخمدان

$$F = \frac{nG}{g} \quad \text{فرمول ۱-۲}$$

n= تعداد تخم های نمونه

g= وزن نمونه

با استفاده از فرمول ۲-۲ شاخص گنادوسوماتیک (GSI) محاسبه می شود:

$$GSI = \frac{\text{ovary W.}}{\text{Total W.}} \quad \text{فرمول ۲-۲}$$

از ماهیهای نر گونه *Barbus sharpeyi* که در یک مرحله همزمان با تزریق مرحله دوم با محلول غده هیپوفیز و گرلین مرحله دوم (۹۰٪) تزریق شده اند؛ برای لقاح با تخمک های استحصالی استفاده می شود و در ظروف مربوطه تخمک ها و اسپرم ها به کمک پر برای افزایش شانس لقاح هم زده می شوند (شکل ۲-۲۳).



شکل ۲-۲۳ لقاح مصنوعی

برای رفع چسبندگی تخم ها باید چندین بار با آب جاری در ظروف پلاستیکی شستشو می شوند و سپس از محلول تانن استفاده گردید (شکل ۲-۲۴).



شکل ۲-۲۴ شستشو تخم ها

تخم ها با شستشو تغییر رنگ و سایز می دهند و در این هنگام در انکوباتور (ویس) با آب جاری ریخته می شوند؛ پس از ۲۴ ساعت کلیه تخمک های مناسب لقاح یافته و تغییر رنگ می دهند که با برداشت یک نمونه از درون ویس و شمارش تخم های لقاح یافته نسبت به کل تخم های نمونه، درصد لقاح بدست می آید. (شکل ۲-۲۵)



شکل ۲-۲۵ انتقال تخم ها به انکوباتور ویس

تخم ها پس از ۷۲-۹۰ ساعت در انکوباتور ویس هچ شده و میزان تخم های هچ شده و درصد بازماندگی آنها و تبدیل به لارو محاسبه شد. لاروها پس از این مدت به انکوباتور بزرگتر (زوک) منتقل شده و ۶-۷ روز در آنجا نگهداری و سپس به استخرها آزادسازی شدند (شکل ۲-۲۶).



شکل ۲-۲۶ انتقال لاروها به انکوباتور زوک

۲-۳-۷ مطالعات آماری

در بخش مطالعات هورمونی چهار تیمار با دو تکرار وجود داشته و در بخش مطالعات بافتی و بازماندگی تخم و لارو پنج تیمار با دو تکرار وجود داشته است. ارقام حاصل از دو تکرار جداگانه مورد تحلیل قرار گرفت، و بعد تیمارها در دو تکرار با یکدیگر مقایسه شدند. محاسبات ریاضی و ترسیم نمودارها توسط نرم افزار Excel انجام شد.

به منظور تحلیل آماری داده ها از نرم افزار SPSS استفاده شد. در بخش نتایج هورمونی به منظور تعیین وجود یا عدم وجود تفاوت در میانگین میزان هورمون GTH-II (متغیر کمی) در چهار تیمار مورد بررسی آنالیز واریانس یک طرفه (One Way Anova) داده ها انجام شد، زیرا تیمارها از لحاظ آماری مستقل از یکدیگر هستند، و به منظور مقایسه دوبدو میانگین ها در بین تیمارها از تحلیل Post Hoc و آزمون مقایسه LSD در سطح اطمینان ۹۵٪ استفاده شد (افشین نیا، ۱۳۷۸). برای تعیین وجود تفاوت در میانگین هورمون در چهار زمان نمونه برداری از آزمون t زوج استفاده گردید زیرا گروههای زمانی مورد مقایسه وابسته به یکدیگر می باشند (Unniappan et al., 2004).

در بخش نتایج بافتی برای تعیین تفاوت میان میانگین وزن و طول بدن، وزن و حجم تخمدان، درصد فولیکولهای بالغ و نابالغ و قطر فولیکول ها در هر یک از مراحل اووژنز به دلیل وجود بیش از دو گروه مستقل از یکدیگر و کمی بودن متغیرهای ذکر شده آنالیز واریانس یک طرفه (One Way Anova) داده ها انجام شد، برای تعیین وجود تفاوت یا عدم تفاوت میانگین ها در بین تیمارها از تحلیل Post Hoc و آزمون LSD در سطح اطمینان ۹۵٪ استفاده شد (افشین نیا، ۱۳۷۸).

از آنجایی که از میان پنج تیمار بررسی شده فقط دو تیمار تخم کشی شد، لذا برای مقایسه میانگین درصد همآوری، لقاح، هچ و بازماندگی لارو میان دو گروه مستقل از آزمون t مستقل استفاده شد (افشین نیا، ۱۳۷۸) ارقام معنی دار در سطح اطمینان ۹۵٪ بدست آمد.

به منظور مقایسه هر یک از تیمارها در دو تکرار، از آزمون t زوج استفاده شد و ارقام معنی دار در سطح اطمینان ۹۵٪ بررسی شد.



فصل سوم

نتایج



۱-۳ نتایج هورمونی

اندازه گیری هورمون GTH-II در چهار تیمار شم، تیمار یک و دو گرلین و تیمار غده هیپوفیز در زمانهای تعیین شده، نشان می دهد میزان این هورمون در هر چهار تیمار در زمان ۹۰ دقیقه افزایش معنی داری نسبت به سایر زمانها نشان می دهد ($P<0.05$).

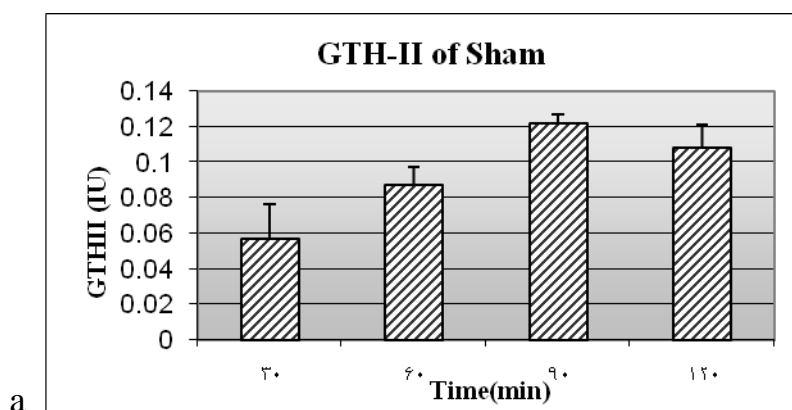
میزان هورمون در هر یک از چهار تیمار در زمانهای ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه پس از تزریق در جدول ۱-۳ ذکر شده است.

جدول ۱-۳ میزان هورمون (IU) در هر یک از تیمارها در چهار زمان نمونه برداری

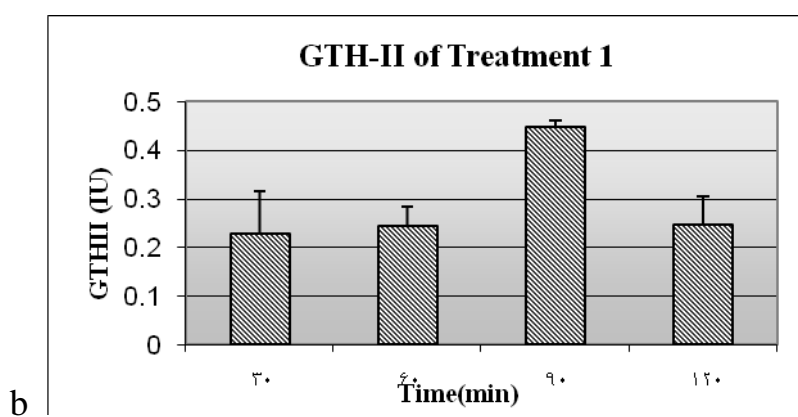
تیمار/زمان	۳۰ دقیقه	۶۰ دقیقه	۹۰ دقیقه	۱۲۰ دقیقه
شم زمان صفر	0.057 ± 0.02	0.087 ± 0.01	0.12 ± 0.06	0.1 ± 0.12
تیمار یک گرلین	0.23 ± 0.09	0.24 ± 0.04	0.45 ± 0.02	0.25 ± 0.06
تیمار دو گرلین	0.16 ± 0.06	0.18 ± 0.07	0.49 ± 0.03	0.22 ± 0.09
تیمار هیپوفیز	0.11 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.31 ± 0.03	0.2 ± 0.02

نتایج حاصله به صورت نمودار ۱-۳ قسمت a-d ذکر شده است.

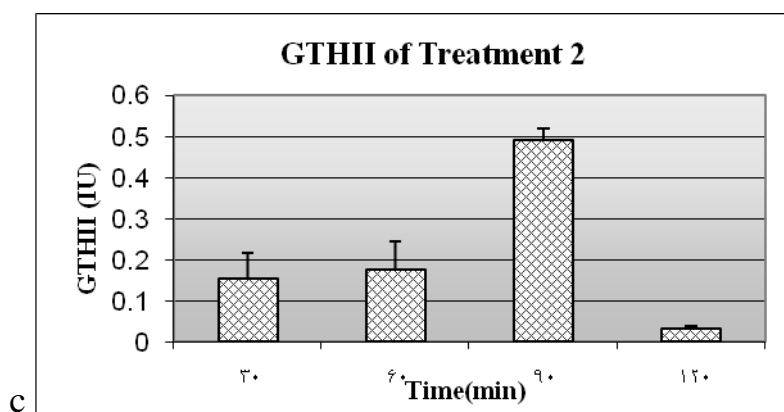
نمودار ۱-۳ میزان هورمون GTH-II در هر یک از چهار تیمار a-d



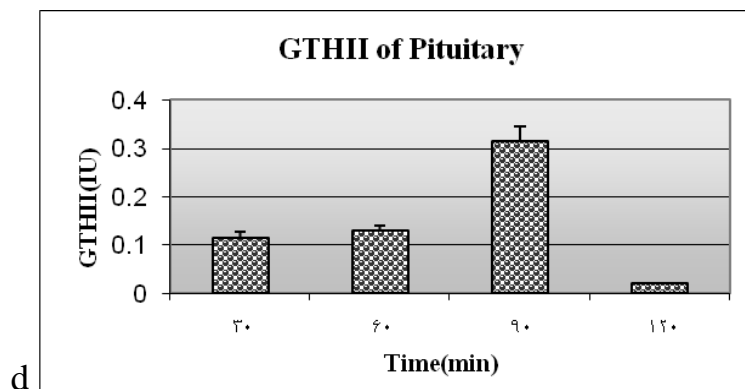
میزان GTH-II در زمانهای مختلف تیمار شم



میزان GTH-II در زمانهای مختلف تیمار یک گرلین (۱۰۰ ng)



میزان GTH-II در زمانهای مختلف تیمار دو گرلین (۱۰۰ ng)



d

میزان GTH-II تیمار غده هیپوفیز

مقایسه هورمونی تیمار شم و تیمار گرلین نشان می دهد بین میزان هورمون تیمار شم و تیمار یک گرلین و میان میزان هورمون تیمار شم و تیمار دو گرلین اختلاف معنی دار وجود دارد ($P < 0.05$). در میزان هورمون تیمار یک و دو گرلین اختلاف معنی دار مشاهده نگردید و تزریق دوز 100 ng گرلین باعث افزایش معنی داری در سطح پلاسمایی هورمون مورد نظر می شود و تزریق دوز بالاتر اثر معنی داری ندارد ($P > 0.05$).

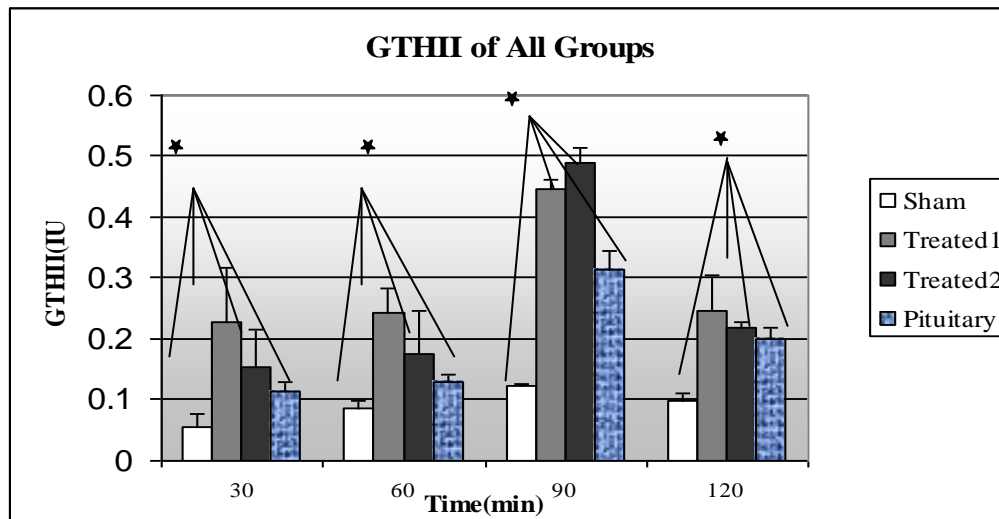
میزان هورمون تیمار هیپوفیز با تیمار شم اختلاف معنی دار نشان می دهد ($P < 0.05$). مقادیر P value تیمارهای مورد مقایسه در جدول ۲-۳ ذکر شده است.

جدول ۲-۳ مقادیر P value در مقایسه دوتایی چهار تیمار مورد مطالعه از نظر هورمونی توسط Anova (LSD)

Compared Treatments	P value	n (تعداد ماهی)
Sham – Pituitary	0.047*	4
Sham – Treated 1	0.02*	4
Sham – Treated 2	0.039*	4
Treated 1 – Treated 2	0.718	4
Treated 1 – Pituitary	0.174	4
Treated 2 - Pituitary	0.303	4

* مقادیر در سطح اطمینان ۹۵٪ اختلاف معنی دار دارند.

مقایسه نتایج هورمونی کلیه تیمارهای مورد بررسی در نمودار ۲-۳ ذکر شده است.



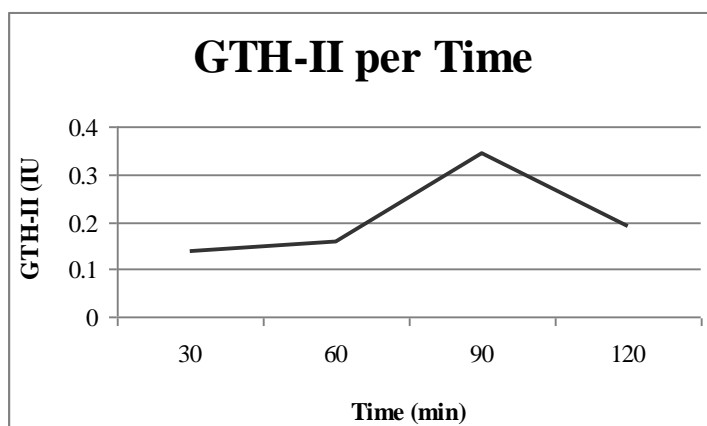
نمودار ۲-۳ مقایسه چهار تیمار مورد مطالعه از نظر میزان هورمون GTH-II در زمانهای مختلف

بیانگر اختلاف معنی دار بین تیمارهای مورد اشاره می باشد.

★

مقایسه چهار تیمار با هم بیانگر اثر مثبت تیمار گرلین بر میزان هورمون GTH-II در مقایسه با سایر تیمارها می باشد (نمودار ۲-۳). اختلاف بین تیمارهای مورد اشاره معنی دار است ($P < 0.05$).

مقایسه سطح پلاسمایی هورمون مورد نظر در کلیه تیمارها در چهار زمان تعیین شده نشان می دهد میزان هورمون در ۳۰ دقیقه پس از تزریق سرم فیزیولوژی و محلول گرلین و غده هیپوفیز، پایین است اما در دقایق بعد به تدریج افزایش می یابد در ۶۰ دقیقه پس از تزریق افزایش معنی دار است ($P < 0.05$)؛ در ۹۰ دقیقه پس از تزریق هورمون به بالاترین میزان خود می رسد ($P < 0.05$)؛ ۱۲۰ دقیقه پس از تزریق هورمون به تدریج کاهش می یابد اما نسبت به ۳۰ دقیقه پس از تزریق افزایش سطح هورمون همچنان معنی دار است ($P < 0.05$). پس از ۱۲۰ دقیقه که از تزریق محلولهای مورد نظر به تیمارها گذشت، میزان هورمون در خون کاهش چشمگیری می یابد اما به صفر نمی رسد و در یک سطح پلاسمایی مشخص می ماند. لذا هورمون پیتیدی مذکور نمودار پالسی دارد (نمودار ۳-۳).



نمودار ۳-۳ نمودار پالسی GTH-II در زمانهای مختلف خونگیری

مقادیر P value چهار زمان مورد مقایسه از نظر سطح هورمونی در جدول ۳-۳ ذکر شده است. جدول ۳-۳ مقادیر P value در مقایسه دوبدو از نظر زمانهای مورد مطالعه توسط آزمون t زوج

Compared Times (min)	P value(n=4)
30-60	0.016*
30-90	0.039*
30-120	0.039*
60-90	0.056
90-120	.078
60-120	0.109

* بیانگر اختلاف معنی دار مقادیر در سطح اطمینان ۹۵٪ می باشد.

۲-۳ نتایج بافتی

۱-۲-۳ نتایج مطالعات ماکروسکوپی

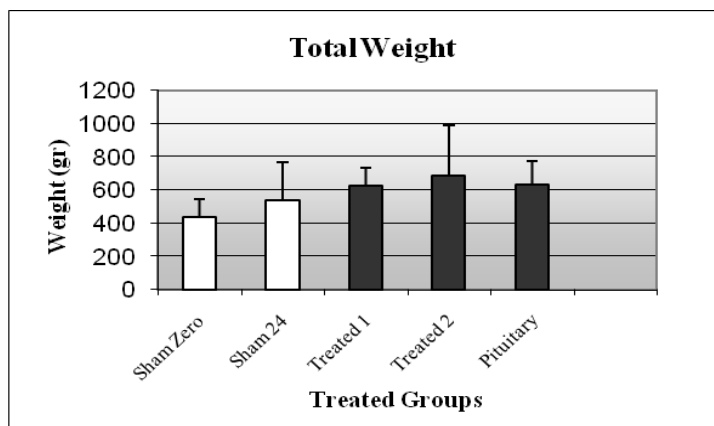
تخمندان های ماهی بنی بصورت یک زوج ساختمانهای طویل بوده که در طول قسمت جانبی و شکمی کیسه شنا، در زیر دیواره محوطه بطنی قرار داشتند و در قسمت خلفی به یکدیگر متصل شده و از طریق منفذ تناسلی به خارج باز می شوند (شکل ۱-۳).



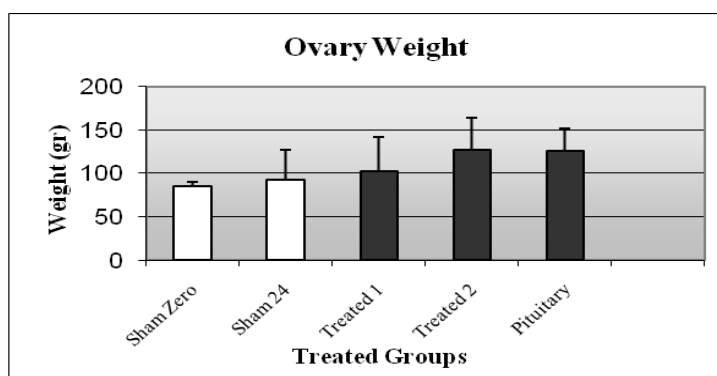
شکل ۱-۳ موقعیت تخمدان ها اطراف کیسه شنا

تخمدان ها از نظر وزنی متفاوت بوده اما از نظر شکل و رنگ همگی بادامی شکل و سبز رنگ بودند و در فاز رسیدگی قرار داشتند.

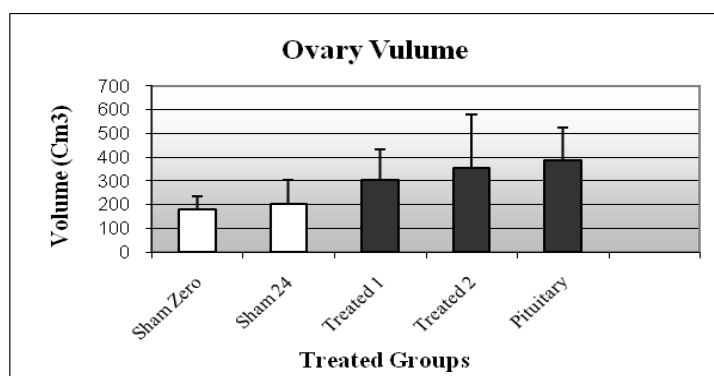
میانگین وزن کل بدن، وزن و حجم تخمدان و شاخص گنادوسوماتیک در نمودارهای ۳-۴ تا ۳-۷ ذکر شده است.



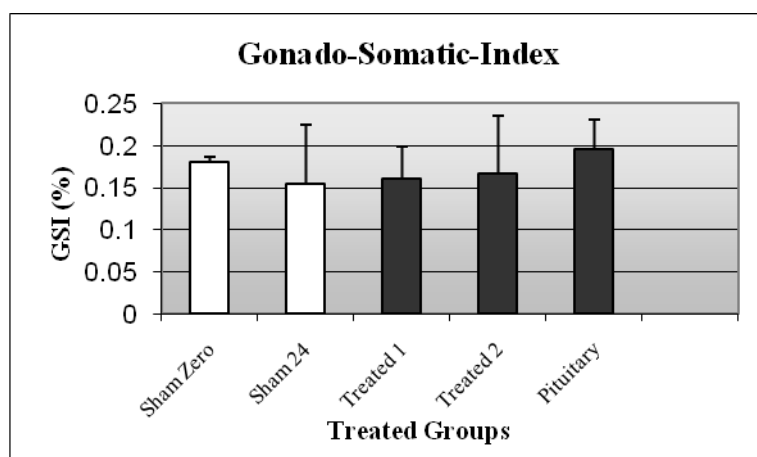
نمودار ۳-۴ میانگین وزن کل بدن در تیمارهای مورد مطالعه



نمودار ۳-۵ میانگین وزن تخمدان در تیمارهای مورد مطالعه



نمودار ۳-۶ میانگین حجم تخمدان در تیمارهای مورد مطالعه



نمودار ۳-۷ شاخص GSI در تیمارهای مورد مطالعه

میانگین وزن بدن، وزن گناد، شاخص گنادو سوماتیک و حجم تخمدان در پنج تیمار مورد بررسی در جدول ۳-۴ ذکر شده است.

جدول ۳-۴ میانگین وزن بدن، وزن تخمدان و GSI ماهی بنی در چهار تیمار مورد مطالعه

تیمار	وزن کل (گرم)	وزن تخمدان (گرم)	GSI(%)	حجم تخمدان (cm ³)
شم زمان صفر	435±114	85±4.5	0.18±0.006	180.9±52
شم زمان ۲۴ ساعت	536±232.47	93.03±34	0.154±0.07	204.6±97
تیمار یک گرلین	627±109.5	101.9±39.7	0.16±.04	305±126
تیمار دو گرلین	690±303	127.4±37	0.167±0.07	354±227
تیمار هیپوفیز	635±141	126.3±25.9	0.195±0.035	386±136

میانگین وزن کل بدن و تخمدان، حجم تخمدان و شاخص GSI به کمک آزمون LSD مقایسه شدند. در کلیه تیمارها تفاوت معنی داری ($P > 0.05$) از لحاظ وزن بدن، وزن و حجم تخمدان و شاخص GSI مشاهده نگردید.

مقادیر P value تیمارهای مورد مقایسه در جدول ۳-۵ ذکر شده است.

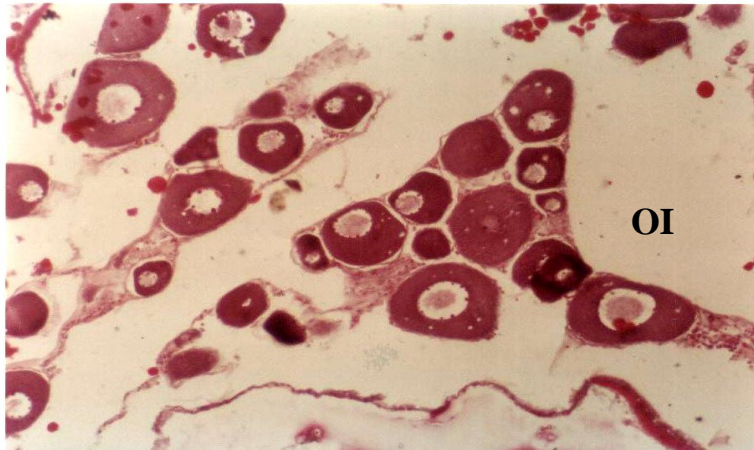
جدول ۳-۵ مقادیر P value تیمارهای مورد مقایسه از نظر وزن کل بدن، وزن و حجم تخمدان و GSI

n	حجم تخمدان	GSI	وزن تخمدان	وزن کل بدن	تیمارهای مقایسه شده
4	0.342	0.218	0.180	0.18	شم صفر-شم ۲۴ ساعته
4	0.224	0.200	0.150	0.093	شم صفر-تیمار یک گرلین
4	0.125	0.110	0.055	0.057	شم صفر-تیمار دو گرلین
4	0.57	0.052	0.057	0.103	شم صفر-تیمار هیپوفیز
4	0.133	0.957	0.913	0.702	شم ۲۴-تیمار یک گرلین
4	0.58	0.687	0.510	0.458	شم ۲۴-تیمار دو گرلین
4	0.58	0.424	0.461	0.744	شم ۲۴ ساعته-تیمار هیپوفیز
4	0.290	0.727	0.581	0.715	تیمار یک-تیمار دو گرلین
4	0.288	0.455	0.528	0.955	تیمار یک گرلین-تیمار هیپوفیز
4	0.977	0.687	0.936	0.672	تیمار دو گرلین-تیمار هیپوفیز

۳-۲-۲ نتایج مطالعات میکروسکوپی

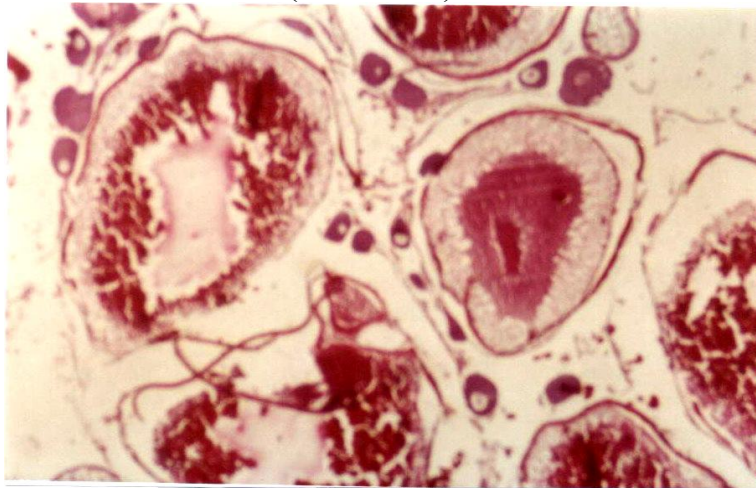
- نتایج هیستولوژی

مشاهدات میکروسکوپی نشان داد که تخمدان ماهی بنی توسط لایه احشایی صفاق پوشیده شده و زیر آن لایه ظریف سفید از جنس بافت همبند سست قرار گرفته است. تیغه های تخمک زا که از بافت همبند و عروق خونی تشکیل شده به داخل تخمدان نفوذ می کنند (تصویر ۳-۲).



تصویر ۲-۳ تیغه تخمک ز تخمدان ماهی بنی OI: تیغه های تخمک ز (H&E $\times 3.2$)

در برش میکروسکوپی یک مراحل مختلف رشد اووسیت مشاهده گردید و همانطور که در فصل قبل ذکر شد تخمدان ماهی بنی همانند سایر کپورماهیان، ناهمزمان است (تصویر ۳-۳).

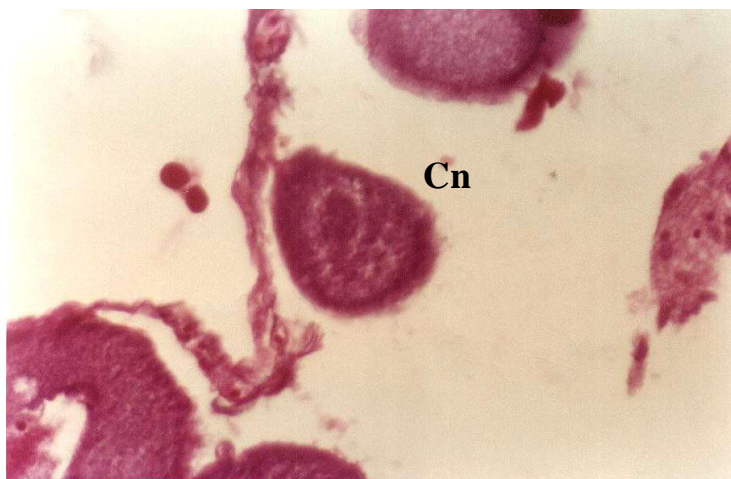


تصویر ۳-۳ تخمدان ناهمزمان (تخمک ها با اندازه های متفاوت) ماهی بنی (H&E $\times 3.2$)

مراحل مختلف رشد اووسیت ماهی بنی در تیمارهای مورد بررسی به شرح زیر می باشد:

۱- مرحله کروماتین نوکلئولوس

میانگین قطر فولیکول در این مرحله $9/6 \pm 65/2$ میکرومتر می باشد. در این مرحله دامنه قطر فولیکول $105/4$ - $30/6$ میکرومتر بوده که بیشترین میانگین قطر در بین پنج تیمار مربوط به تیمار دو $77/5$ میکرومتر می باشد. هسته هنوز وزیکوله نشده اما کاملاً بازوفیلی بوده و سیتوپلاسم کمی بازوفیلیک است (تصویر ۳-۴).



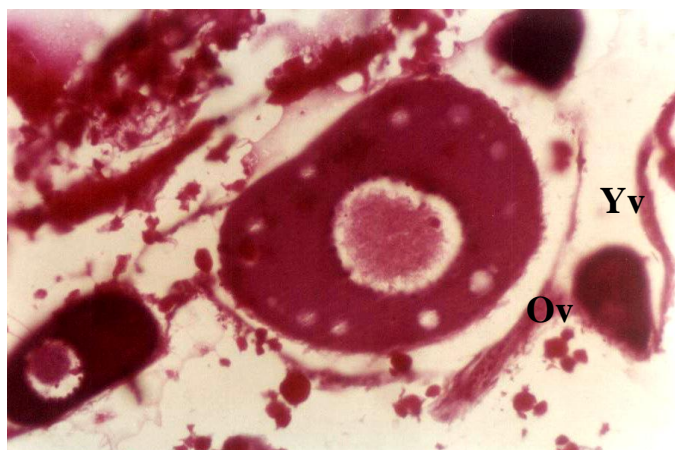
تصویر ۳-۴ ساختار بافتی اووسیت ماهی بنی در مرحله کروماتین نوکلئولوس (Cn) (H&E $\times 10$)
۲- مرحله پری نوکلئولوس

قطر فولیکول افزایش می یابد. میانگین قطر در این مرحله $90 \pm 53/6$ میکرومتر می باشد. دامنه قطر ۲۳۸-۳۴ میکرومتر بوده و بیشترین میانگین قطر مربوط به تیمار شم صفر، $129/77$ میکرومتر می باشد. سیتوپلاسم کاملاً بازوفیلیک و هسته دارای هستک های محیطی می باشد. یک توده خارج هسته ای بازوفیلی به نام اجسام بالبینانی شکل می گیرد (تصویر ۳-۵).

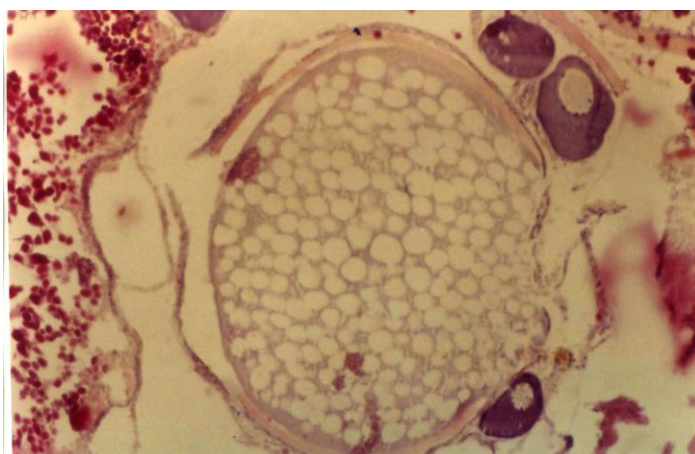


تصویر ۳-۵ ساختار بافتی اووسیت ماهی بنی در مرحله پری نوکلئولوس (Pn) (H&E $\times 10$)

۳- مرحله وزیکول زرده
میانگین قطر فولیکول در این مرحله به $329 \pm 46/7$ میکرومتر می رسد. دامنه قطر فولیکول ۱۸۷-۵۷۸ میکرومتر بوده و بیشترین میانگین قطر مربوط به شم ۲۴ ساعته، $386/8$ میکرومتر می باشد. از شدت بازوفیلی سیتوپلاسم کاسته و شکل هسته نامنظم شده و وزیکولهای چربی به صورت واکوئولهای خالی بدون رنگ در قسمت محیطی سیتوپلاسم دیده می شوند (تصویر ۳-۶). وزیکولهای چربی به تدریج کل سیتوپلاسم را احاطه می کنند (تصویر ۳-۷).



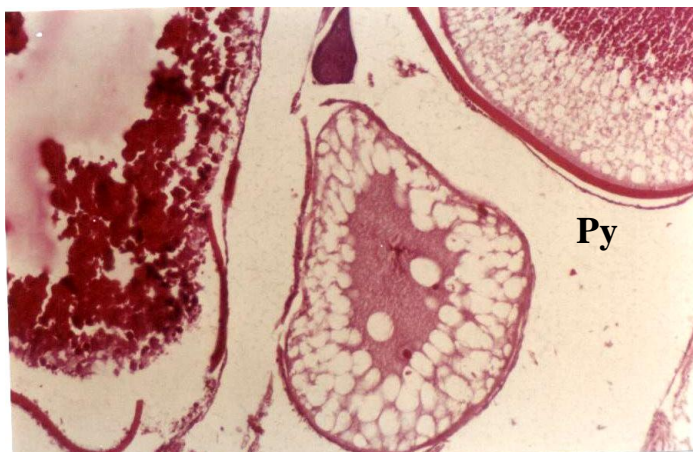
تصویر ۳-۶ ساختار بافتی اووسیت ماهی بنی در مرحله وزیکول چربی (H&E $\times 10$)
 Yv: اووسیت
 Ov وزیکولهای چربی



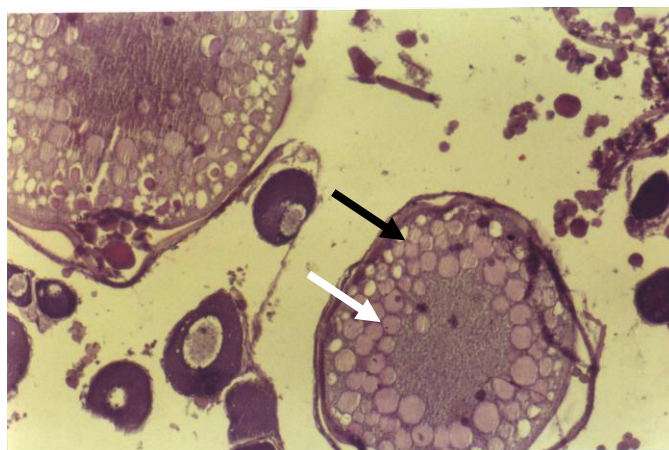
تصویر ۳-۷ ساختار بافتی اووسیت ماهی بنی در مرحله آخر وزیکول چربی (H&E $\times 10$)

۴- مرحله زرده سازی اولیه

قطر فولیکول افزایش می یابد. میانگین قطر این مرحله $540 \pm 96/05$ میکرومتر بوده و دامنه قطر فولیکول $340-850$ میکرومتر بود. بیشترین میانگین قطر در تیمار شم ۲۴ ساعته، 680 میکرومتر دیده شد. شدت بازوفیلی سیتوپلاسم بسیار کاهش یافته و گرانولهای ریز زرده ای اسیدوفیل در بین وزیکولهای چربی و در قسمت محیطی سیتوپلاسم قرار می گیرند (تصویر ۳-۸). گرانولهای زرده باعث داشتن کربوهیدرات در پاسخ به رنگامیزی PAS رنگ قرمز می گیرند و وزیکولهای چربی سفید می مانند (تصویر ۳-۹).



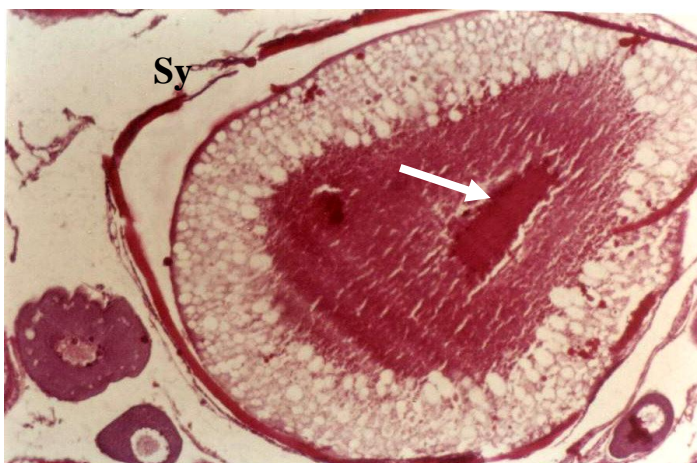
تصویر ۳-۸ ساختار بافتی اووسیت ماهی بنی در مرحله زرده سازی اولیه (Py) (H&E $\times 10$)



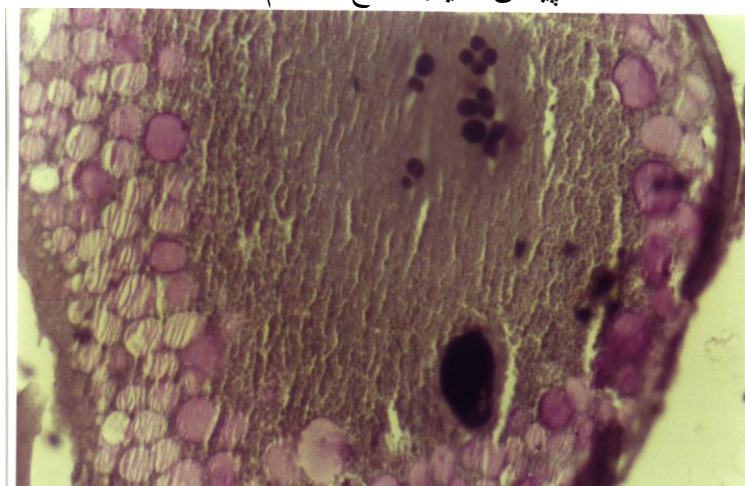
تصویر ۳-۹ ساختار بافتی اووسیت ماهی بنی در مرحله زرده سازی اولیه (PAS $\times 10$)
پیکان سیاه: وزیکول چربی پیکان سفید: گرانول زرده

۵- مرحله زرده سازی ثانویه

میانگین قطر به $658 \pm 77/8$ میکرومتر و دامنه قطر به $442 - 884$ میکرومتر می رسد؛ بیشترین رقم قطر در تیمار شم ۲۴ ساعته، $754/4$ میکرومتر دیده می شود. تعداد گرانولهای زرده و وزیکولهای چربی افزایش یافته به طرف مرکز حرکت و تمام سیتوپلاسم را پر می کنند لذا سیتوپلاسم کاملاً اسیدوفیل است، سطح هسته نامنظم است (تصویر ۳-۱۰). اووسیت در این مرحله به رنگامیزی PAS جواب مثبت می دهد (تصویر ۳-۱۱).



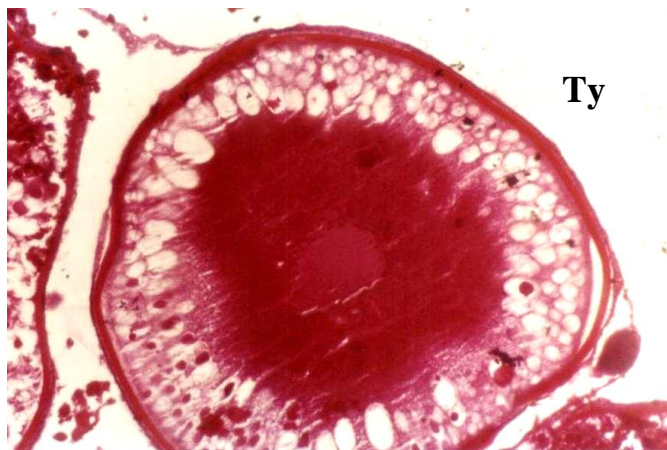
تصویر ۳-۱۰ ساختار بافتی اووسیت ماهی بنی در مرحله زرده سازی ثانویه (Sy) (H&E $\times 10$)
پیکان سفید: سطح نامنظم هسته



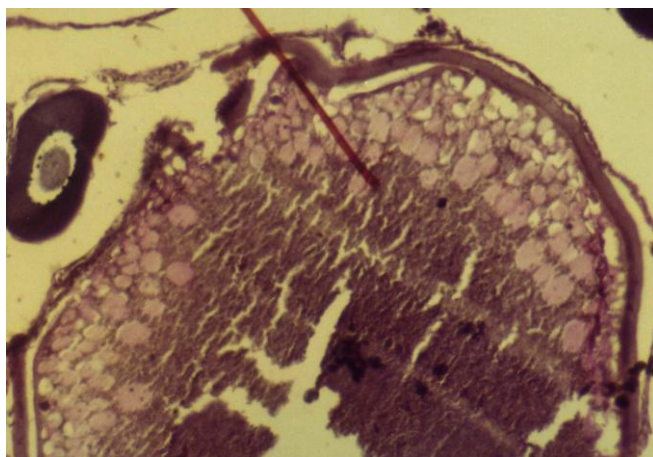
تصویر ۳-۱۱ ساختار بافتی اووسیت ماهی بنی در مرحله زرده سازی ثانویه (PAS $\times 40$)

۶- مرحله زرده سازی ثالثیه

رشد نهایی فولیکول دیده می شود، میانگین قطر 943 ± 104 میکرومتر و دامنه قطر فولیکول ۱۱۹۰-۶۴۶ میکرومتر می باشد. بیشترین میانگین قطر فولیکول در تیمار شم ۲۴ ساعته مشاهده می گردد. تعداد گرانولهای زرده افزایش یافته و تعدادی از آنها با هم ترکیب می شوند و توده ای شکل می شوند هسته نامشخص است فولیکولها بسیار شکننده اند و ممکن است توسط تیغه میکروتوم هنگام برش گیری پاره یا آترزی و جذب شوند (تصویر ۳-۱۲). نتیجه رنگامیزی PAS این مرحله مثبت است (تصویر ۳-۱۳).



تصویر ۱۲-۳ ساختار بافتی اووسیت ماهی بنی در مرحله زرده سازی ثالثیه (Ty) (H&E $\times 3.2$)

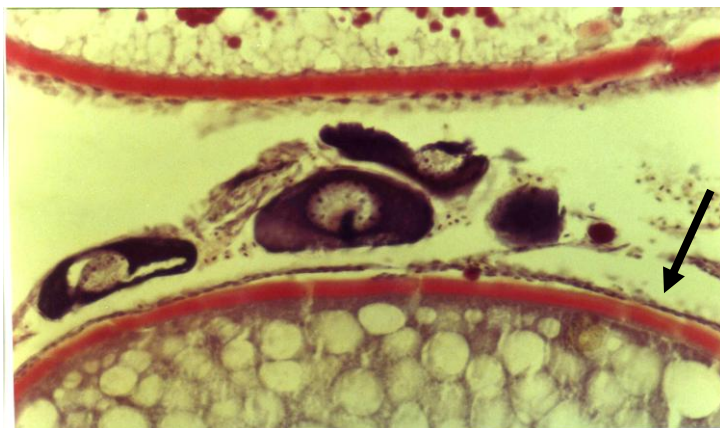


تصویر ۱۳-۳ ساختار بافتی اووسیت ماهی بنی در مرحله زرده سازی ثالثیه (PAS $\times 20$)

اطراف فولیکولهای تخمدانی توسط لایه ای از *Zona Radiata* و لایه *Granulosa* احاطه شده است (تصویر ۱۴-۳ و ۱۵-۳).



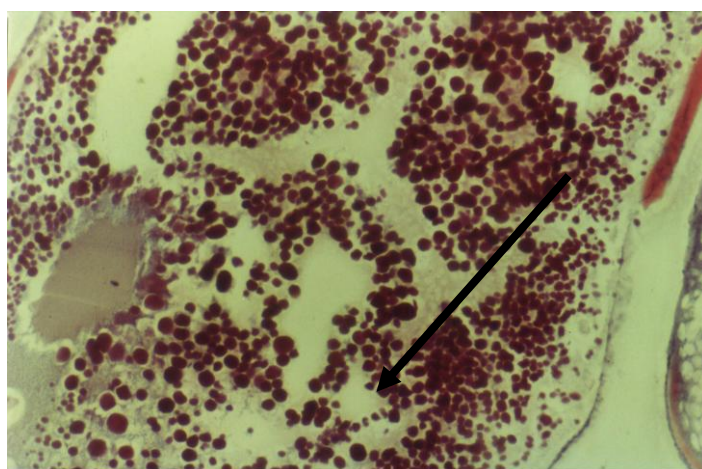
تصویر ۱۴-۳ *Zona Radiata* کامل اطراف یک فولیکول در تخمدان ماهی بنی (H&E $\times 10$)



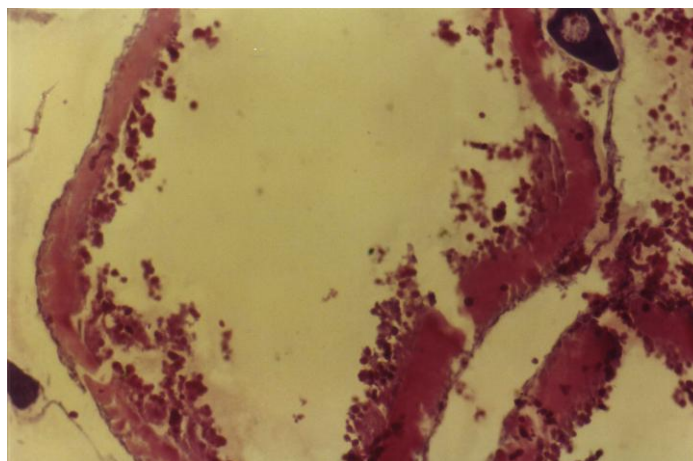
تصویر ۱۵-۳ Zona Radiata کامل اطراف یک فولیکول در تخمدان ماهی بنی (H&E $\times 20$)
پیکان: لایه گرانولوزا

- مرحله بلوغ

در این مرحله هسته به قطب حیوانی مهاجرت کرده و تقسیم اول میوزی انجام می شود و اولین جسم قطبی آزاد می گردد. سپس تقسیم دوم میوز آغاز شده و تخم در مرحله متافاز متوقف شده و رها می شود و آنچه می ماند فولیکول تحلیل رفته که در بعضی پارگی لایه سولی زونا رادیاتا و هیپرتروفی سلولهای گرانولوزا دیده می شود (تصویر ۱۶-۳ و ۱۷-۳).



تصویر ۱۶-۳ مهاجرت هسته در فولیکول بالغ ماهی بنی (H&E $\times 10$)



تصویر ۳-۱۷ اوسیت آتروفه ماهی بنی (H&E ×10)

- نتایج میکرومتری

تمام تیمارهای مورد مطالعه مراحل مختلف بلوغ اوسیتی را داشتند ، لذا برای تشخیص میزان تأثیر تیمارها نتایج حاصل از هیستومتری و میکرومتری لامها و تحلیل آماری آنها لازم می باشد. نتایج در جداول ۳-۶ و ۳-۷ ذکر شده است.

جدول ۳-۶ نتایج میکرومتری- میانگین درصد فولیکولهای بالغ و نابالغ در پنج تیمار مورد مطالعه

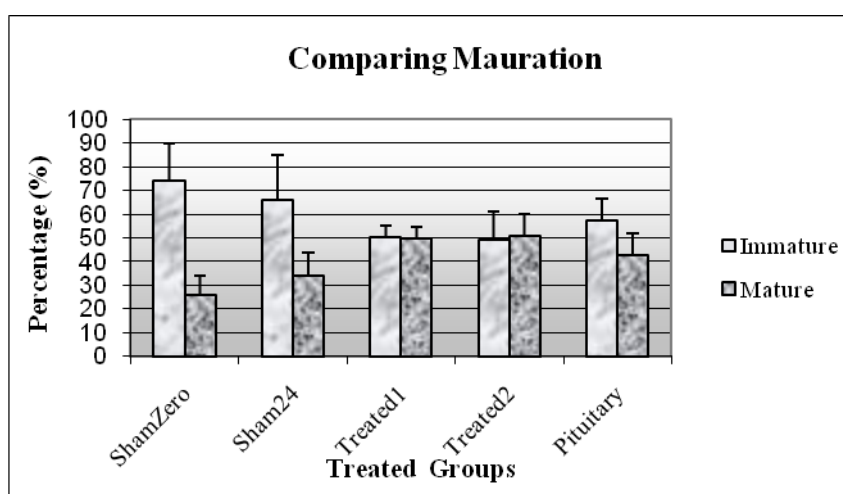
تیمار	فولیکول نابالغ (%)	فولیکول بالغ (%)
شم در زمان صفر	74±16	26±8
شم در زمان ۲۴ ساعت	66±19	34±10
تیمار یک گرلین	50.2±4.9	49.8±4.8
تیمار دو گرلین	49±12	51±9
تیمار هیپوفیز	57.5±9.2	42.5±9.2

در این بخش درصد فولیکولهای نابالغ و بالغ و قطر اوسیت در شش مرحله اوژنز در پنج تیمار مورد مطالعه محاسبه و مقایسه شده است. فولیکولهای مراحل ۱ و ۲ و ۳ اوژنز به عنوان فولیکول نابالغ و فولیکولهای مراحل سه گانه زرده سازی به عنوان فولیکول بالغ مشخص شدند.

جدول ۷-۳ نتایج میکرومتری - میانگین قطر اووسیت در شش مرحله اووژنز (mm) در پنج تیمار مورد مطالعه

مرحله/تیمار	کروماتین نوکلئولوس	پری نوکلئولوس	وزیکول زرده	سازی زرده اولیه	سازی زرده ثانویه	زرده سازی ثالثیه
شم زمان صفر	0.055±0.026	0.13±0.042	0.28±0.058	0.476±0.054	0.593±0.101	0.935±0.13
شم ۲۴ ساعته	0.069±0.021	0.121±0.038	0.387±0.103	0.676±0.137	0.761±0.109	1.093±0.126
تیمار یک گرلین	0.06±0.027	0.107±0.051	0.347±0.08	0.478±0.081	0.68±0.101	0.913±0.131
تیمار دو گرلین	0.078±0.015	0.111±0.023	0.306±0.071	0.527±0.099	0.625±0.105	0.839±0.107
تیمار هیپوفیز	0.096±0.025	0.138±0.031	0.403±0.04	0.595±0.066	0.733±0.089	0.962±0.101

به منظور مقایسه میزان تأثیر تیمار گرلین و هیپوفیز بر روند رسیدگی جنسی فولیکولها نسبت به تیمارهای شم نمودار مقایسه ای ذکر شده است و سپس تحلیل آماری مقایسات انجام شده است (نمودار ۸-۳).



نمودار ۸-۳ مقایسه بلوغ اووسیت بر اساس درصد فولیکولهای بالغ و نابالغ در تیمارهای مختلف

درصد فولیکولهای نابالغ در تیمار یک و دو گرلین و تیمار هیپوفیز نسبت به تیمارهای شم صفر و ۲۴ ساعته کاهش معنی دار و در مقابل درصد فولیکولهای بالغ افزایش معنی داری یافته است. مقادیر P value حاصل از مقایسه دوبرو تیمارها در جدول ۸-۳ آورده شده است.

جدول ۳-۸ مقادیر P value تیمارهای مورد مقایسه از نظر فولیکولهای بالغ و نابالغ توسط آزمون LSD

n (تعداد ماهی)	فولیکولهای نابالغ	فولیکولهای بالغ	تیمارهای مورد مقایسه
4	0.707	0.711	شم زمان صفر-شم ۲۴ ساعته
4	0.0001**	0.0001**	شم زمان صفر-تیمار یک گرلین
4	0.001**	0.001**	شم زمان صفر-تیمار دو گرلین
4	0.007**	0.012*	شم زمان صفر-تیمار هیپوفیز
4	0.001**	0.001**	شم ۲۴ ساعته-تیمار یک گرلین
4	0.001**	0.001**	شم ۲۴ ساعته-تیمار دو گرلین
4	0.016*	0.027*	شم ۲۴ ساعته-تیمار هیپوفیز
4	0.924	0.988	تیمار یک گرلین-تیمار دو گرلین
4	0.288	0.211	تیمار یک گرلین-تیمار هیپوفیز
4	0.333	0.216	تیمار دو گرلین-تیمار هیپوفیز

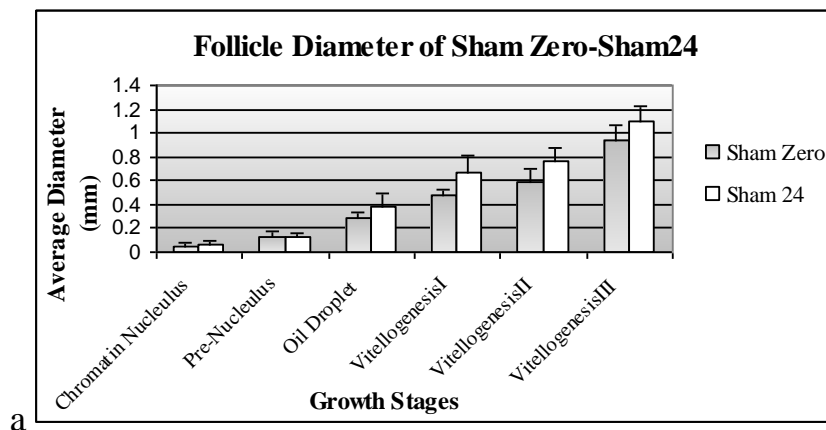
* بیانگر وجود تفاوت معنی دار در دو تیمار است.

** بیانگر وجود تفاوت بسیار معنی دار بین دو تیمار است.

نتایج فوق نشان می دهند هر دو نوع تیمار گرلین و هیپوفیز بر روی بلوغ بافتی تأثیر مثبت داشته است و سبب افزایش تعداد درصد فولیکولهای بالغ شده است.

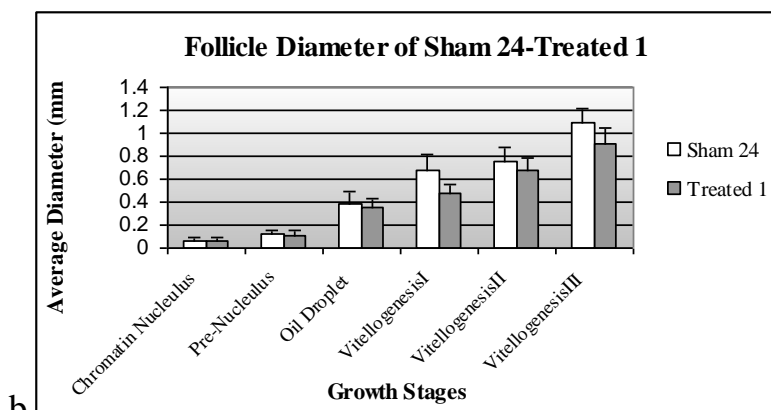
مقایسه دوبرو تیمارها با یکدیگر از نظر قطر فولیکول در نمودار a-g ۳-۹ ذکر شده است.

نمودار a-g-۳ مقایسه دوبدو تیمارهای مورد بررسی از نظر قطر فولیکول



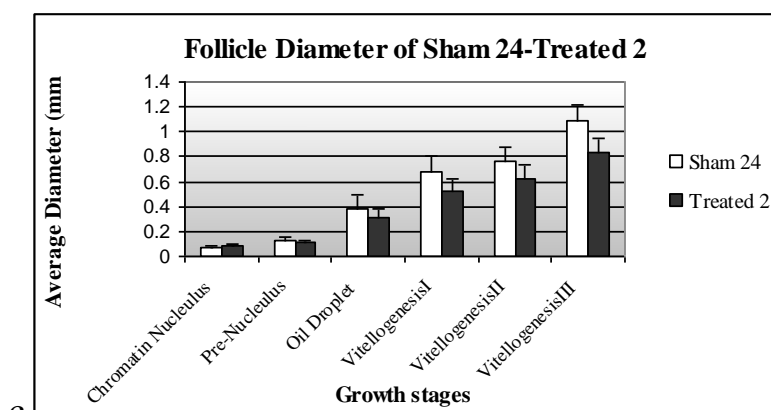
a

مقایسه قطر فولیکول در تیمارهای شم صفر و شم ۲۴ ساعته



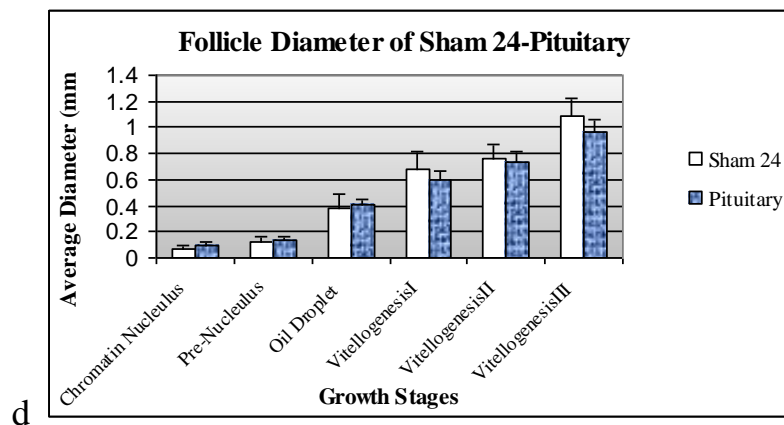
b

مقایسه قطر فولیکول در تیمار شم ۲۴ ساعته و تیمار یک گرلین (۱۰۰ ng)

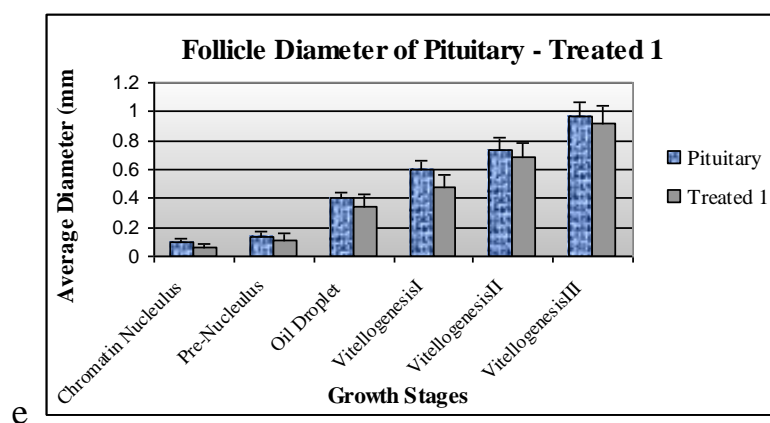


c

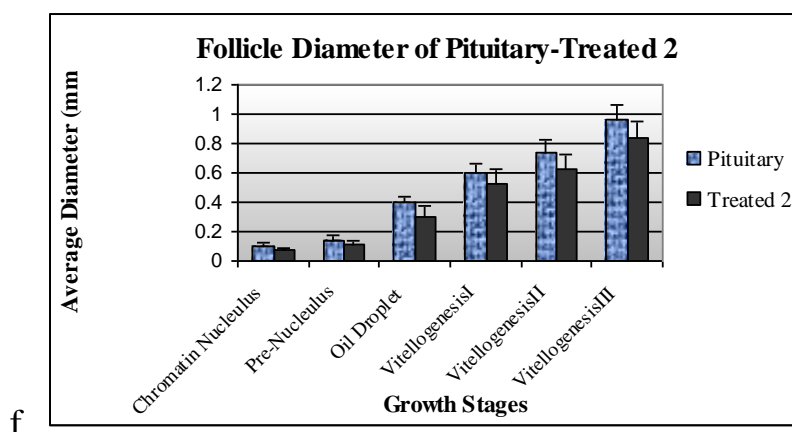
مقایسه قطر فولیکول در تیمار شم ۲۴ ساعته و تیمار دو گرلین (۱۵۰ ng)



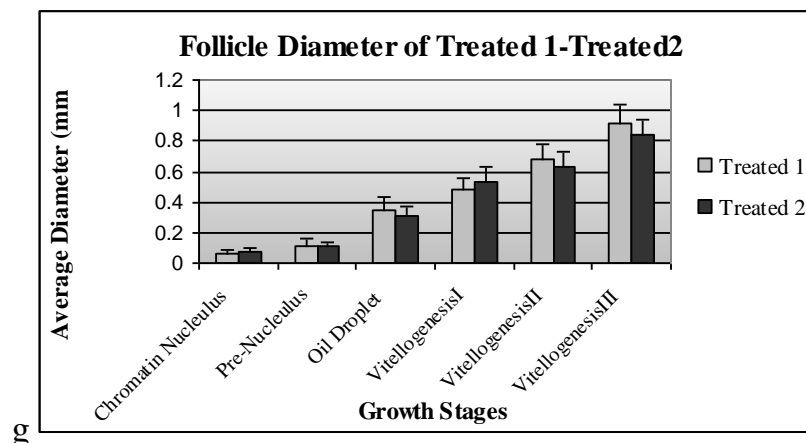
مقایسه قطر فولیکول در تیمار شم ۲۴ ساعته و تیمار هیپوفیز



مقایسه قطر فولیکول در تیمار هیپوفیز و تیمار یک گرلین (۱۰۰ ng)



مقایسه قطر فولیکول در تیمار هیپوفیز و تیمار دو گرلین (۱۵۰ ng)



مقایسه قطر فولیکول در تیمار یک گرلین (۱۰۰ ng) و تیمار دو گرلین (۱۵۰ ng)

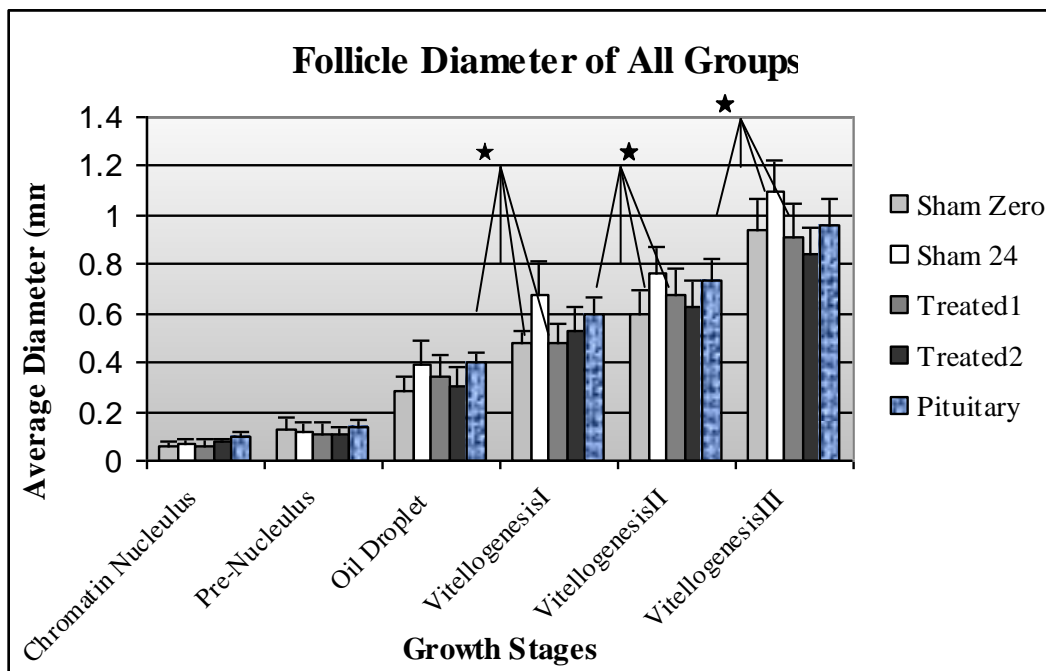
مقایسه نتایج و تحلیل آماری آنها نشان می دهد قطر فولیکول در مراحل سه گانه زرده سازی در تیمار یک و دو گرلین کاهش معنی داری نسبت به تیمارهای شم صفر و ۲۴ ساعته دارد ($P < 0.05$) ، در سایر مراحل اوژنز کاهش قطر در نمودارها دیده می شود اما معنی دار نیست (جدول ۹-۳).

در سایر مقایسات، کاهش مختصر قطر فولیکول در تیمار یک و دو گرلین و تیمار هیپوفیز نسبت به تیمارهای شم صفر و ۲۴ ساعته وجود دارد اما از لحاظ آماری معنی دار نیستند ($P > 0.05$).

جدول ۹-۳ مقادیر معنی دار P value در مقایسه دوبرو تیمارها از نظر قطر فولیکول توسط آزمون LSD

n	زرده سازی ثالثیه	زرده سازی ثانویه	زرده سازی اولیه	تیمارهای مورد مقایسه
4	0.036	0.047	-	شم زمان صفر-تیمار یک گرلین
4	0.01	0.027	-	شم زمان صفر-تیمار دو گرلین
4	-	-	0.003	شم ۲۴ ساعته-تیمار یک گرلین
4	-	-	0.027	شم ۲۴ ساعته-تیمار دو گرلین

مقایسه کلی پنج تیمار مورد بررسی از نظر میانگین قطر فولیکول در نمودار ۱۰-۳ ذکر شده است.



نمودار ۳-۱۰ مقایسه پنج تیمار مورد مطالعه از نظر میانگین قطر فولیکول

★ بیانگر وجود تفاوت در تیمارهای معنی دار است.

۳-۳ نتایج بازماندگی تخم و لارو

از میان ماهیان تیمار شم و تیمار فقط تیمار یک گرلین (۱۰۰ نانوگرم در گرم) و تیمار هیپوفیز موفق به تخم کشی شدند.

۳-۳-۱ همآوری

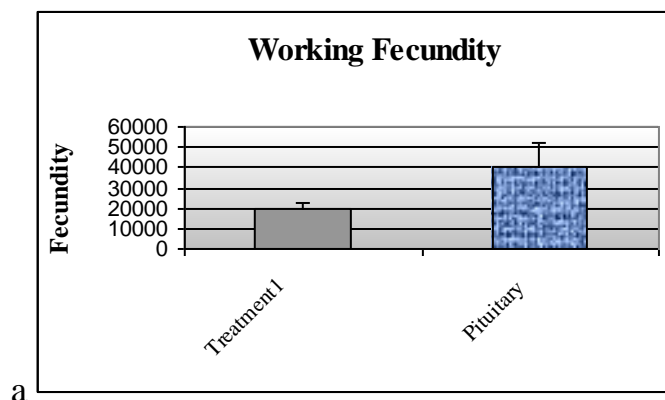
طبق فرمول، همآوری کاری تیمارهای فوق محاسبه شدند. مقادیر همآوری و P value حاصل از مقایسه دو تیمار گرلین و هیپوفیز در جدول ۳-۱۰ ذکر شده و سپس نمودار آنها ذکر شده است (نمودار ۳-۱۱a,b).

جدول ۳-۱۰ همآوری کاری و مقایسه آماری تیمارهای گرلین و هیپوفیز

تیمار هیپوفیز	تیمار یک گرلین	فاکتورهای بیوتکنیک
402±49	200±25	وزن تخمک ها (گرم)
4000±1200	2000±300	همآوری کاری
0.0001**(n=4)		P value (تیمار یک گرلین-تیمار هیپوفیز)

★ بیانگر وجود تفاوت بسیار معنی دار میان دو تیمار است. n: تعداد ماهی

نمودار ۱۱-۳ همآوری کاری تیمار یک گرلین و تیمار هیپوفیز



در تیمار هیپوفیز افزایش معنی داری نسبت به تیمار یک گرلین دیده می شود ($P < 0.05$).

۲-۳-۳ درصد لقاح

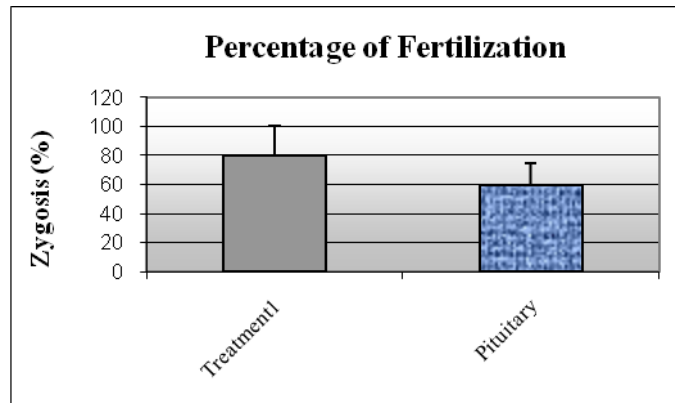
پس از لقاح مصنوعی تخمک ها و اسپرم ها، درصد لقاح از طریق نمونه گیری ۲۴ ساعته از انکوباتور ویس بدست می آید مقادیر عددی لقاح و P value حاصل از مقایسه دو تیمار توسط آزمون t مستقل در جدول ۱۱-۳ و تصاویر آنها در نمودار ۱۲-۳ ذکر شده است.

جدول ۱۱-۳ درصد لقاح و مقایسه آماری در تیمارهای گرلین و هیپوفیز

تیمار هیپوفیز	تیمار یک گرلین	فاکتورهای مورد بررسی
59.68±15	80±20	درصد لقاح
0.0001**(n=4)		P value (تیمار یک گرلین-تیمار هیپوفیز)

**بیانگر وجود تفاوت بسیار معنی دار بین دو تیمار است.

n : تعداد ماهی



نمودار ۳-۱۲ درصد لقاح در تیمار یک گرلین (۱۰۰ng) و تیمار هیپوفیز

درصد لقاح در تیمارهای فوق نشان از افزایش معنی دار موفقیت لقاح در تیمار گرلین نسبت به هیپوفیز دارد ($P < 0.05$).

۳-۳-۳ درصد هج (تفریح)

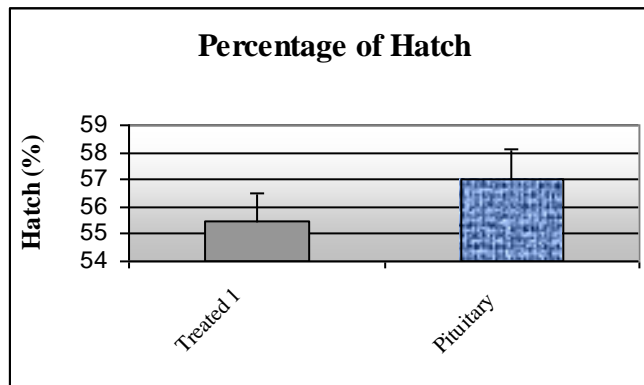
به دلیل اندازه گیری درصد لقاح پس از ۲۴ ساعت، اندازه گیری درصد تفریح در انکوباتور ویس نشان از تغییر کمی اندک میزان تفریح نسبت به میزان لقاح دارد. مقادیر درصد بازماندگی در تیمار هیپوفیز افزایش معنی دار نسبت به تیمار گرلین نشان می دهد. ($P < 0.05$) مقادیر اندازه گیری شده نمودار مربوطه همراه با P value حاصل از مقایسه آماری تیمارها به ترتیب در جدول ۳-۱۲ و نمودار ۳-۱۳ ذکر شده است.

جدول ۳-۱۲ درصد تفریح و مقایسه آماری در تیمارهای گرلین و هیپوفیز

تیمار هیپوفیز	تیمار یک گرلین	فاکتورهای مورد بررسی
57±1.1	55.5±1	درصد تفریح تخم ها
0.033*(n=4)		P value (تیمار یک گرلین-تیمار هیپوفیز)

* بیانگر وجود تفاوت معنی دار در دو تیمار است.

n : تعداد ماهی



نمودار ۳-۱۳ درصد تفریح تخم ها در تیمار یک گرلین (۱۰۰ng) و تیمار هیپوفیز

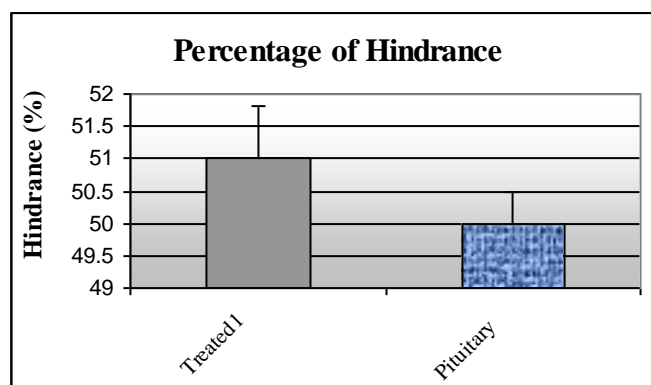
۳-۳-۴ درصد بازماندگی لارو

تعداد لاروهای انکوباتور زوک کاهش اندکی نسبت به تعداد تخم های تفریح شده داشتند، مقادیر بدست آمده در جدول ۳-۱۳ و تصاویر آنها در نمودار ۳-۱۴ ذکر شده است.

جدول ۳-۱۳ درصد بازماندگی لارو و مقایسه آماری در تیمارهای گرلین و هیپوفیز

تیمار هیپوفیز	تیمار یک گرلین	فاکتورهای مورد بررسی
50±0.5	51±0.8	درصد بازماندگی لارو
P value (تیمار یک گرلین-تیمار هیپوفیز)		0.144 (n=4)

n : تعداد ماهی



نمودار ۳-۱۴ درصد بازماندگی لارو در تیمار یک گرلین (۱۰۰ng) و تیمار هیپوفیز

مقایسه آماری دو تیمار فوق نشان می دهد تفاوت معنی داری میان تیمارهای گرلین و هیپوفیز از نظر درصد بازماندگی لاروها وجود ندارد ($P > 0.05$).

۳-۴ مقایسه نتایج حاصل از دو تکرار

نتایج هورمونی: به منظور مقایسه نتایج هورمونی حاصل از دو تکرار جدول ۳-۱۷ ذکر شده است.

جدول ۳-۱۴ مقایسه نتایج هورمونی دو تکرار تیمار های مورد مطالعه با استفاده از آزمون t

تیمار / تکرار	تکرار اول (IU)	تکرار دوم (IU)	P value	n (تعداد ماهی)
شم صفر	0.0935 ± 0.02	0.051 ± 0.01	0.550	4
تیمار یک گرلین	0.290 ± 0.01	0.079 ± 0.02	0.386	4
تیمار دو گرلین	0.21 ± 0.11	0.2 ± 0.03	0.574	4
تیمار هیپوفیز	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.02	0.399	4

با توجه به جدول میان نتایج حاصل از دو تکرار در کل تیمارها تفاوت معنی دار وجود ندارد ($P > 0.05$).

نتایج میکرومتری بافتی: در این قسمت ابتدا نتایج حاصل از شمارش فولیکولهای نابالغ (جدول ۳-۱۵) و بالغ (جدول ۳-۱۶) در دو تکرار با یکدیگر مقایسه شدند، سپس میانگین قطر اووسیت در دو تکرار مقایسه شدند (جدول ۳-۱۷).

جدول ۳-۱۵ مقایسه میانگین فولیکولهای نابالغ تیمارها در دو تکرار با استفاده از آزمون t

تیمار/مقادیر	تکرار اول (%)	تکرار دوم (%)	P value	n (تعداد ماهی)
شم صفر	$74 \pm 16/5$	$72/6 \pm 16/5$	0.103	4
شم ۲۴ ساعته	$65/7 \pm 19/4$	$64/3 \pm 19/7$	0.071	4
تیمار یک گرلین	$50/2 \pm 4/9$	$49/8 \pm 4/9$	0.269	4
تیمار دو گرلین	$49 \pm 12/9$	$48/8 \pm 13$	0.444	4
تیمار هیپوفیز	$57/5 \pm 9$	$56/9 \pm 9$	0.58	4

جدول ۳-۱۶ مقایسه میانگین فولیکولهای بالغ تیمارها در دو تکرار با استفاده از آزمون t

تیمار/مقادیر	تکرار اول (%)	تکرار دوم (%)	P value	n (تعداد ماهی)
شم صفر	۲۶±۱۶/۵	۲۷/۴±۱۶	۰/۰۵۱	۴
شم ۲۴ ساعته	۳۴/۳±۱۹	۳۶/۷±۱۹/۸	۰/۰۹۳	۴
تیمار یک گرلین	۴۹/۸±۴/۹	۴۹/۲±۴/۷	۰/۱۵	۴
تیمار دو گرلین	۵۱±۹	۵۲±۱۱/۵	۰/۲۷۳	۴
تیمار هیپوفیز	۴۲/۵±۹	۴۳/۱±۸/۳	۰/۶۵۶	۴

مقایسه ارقام حاصل از میکرومتری مقاطع در دو نوبت نشان می دهد، هر تیمار در دو تکرار نتیجه مشابهی از نظر تعداد فولیکولها نشان می دهند و اختلاف معنی دار میان دو تکرار وجود ندارد ($P>0.05$).

جدول ۳-۱۷ مقایسه میانگین قطر فولیکول تیمارها در دو تکرار با استفاده از آزمون t

تیمار/مقادیر	تکرار اول (mm)	تکرار دوم (mm)	P value	n (تعداد ماهی)
شم صفر	۰/۴۱±۰/۳۱	۰/۴±۰/۳۲	۰/۲۵۵	۴
شم ۲۴ ساعته	۰/۵۲±۰/۳	۰/۴۹±۰/۳۸	۰/۲۲۰	۴
تیمار یک گرلین	۰/۴۳±۰/۳۲	۰/۴۲±۰/۳۲	۰/۰۹۹	۴
تیمار دو گرلین	۰/۴۲±۰/۳	۰/۴±۰/۳	۰/۰۶۱	۴
تیمار هیپوفیز	۰/۵±۰/۳۴	۰/۴۷±۰/۳۳	۰/۰۹۸	۴

مقایسه آماری میانگین قطر فولیکول در دو تکرار نشان می دهد، میانگین قطر فولیکول تیمارها در تکرار اول با تکرار دوم اختلاف معنی داری ندارد ($P>0.05$).

نتایج بازماندگی تخم و لارو

نتایج حاصل از دو تکرار در شمارش تعداد تخمک های استحصالی و مقایسه آماری آنها در جدول ۳-۱۸ و نتایج مقایسه ای درصد لقاح، درصد تفریح و درصد بازماندگی لاروها در دو تکرار به ترتیب در جداول ۳-۱۹، ۳-۲۰ و ۳-۲۱ ذکر شده است.

جدول ۳-۱۸ مقایسه میانگین همآوری تیمارها در دو تکرار با استفاده از آزمون t

تیمار/مقادیر	تکرار اول	تکرار دوم	P value	n (تعداد ماهی)
تیمار یک گرلین	۲۹±۴/۵	۳۱±۵	۰/۲۲۵	۴
تیمار هیپوفیز	۵۷±۱۴	۶۰±۱۵	۰/۱۴۹	۴

جدول ۳-۱۹ مقایسه میانگین درصد لقاح تیمارها در دو تکرار با استفاده از آزمون t

تیمار/مقادیر	تکرار اول (%)	تکرار دوم (%)	P value	n (تعداد ماهی)
تیمار یک گرلین	۸۰±۲۰	۸۱±۱۹	۰/۲۱۴	۴
تیمار هیپوفیز	۵۹/۶۸±۱۵	۶۰±۱۴	۰/۳۱۳	۴

جدول ۳-۲۰ مقایسه میانگین درصد هچ تیمارها در دو تکرار با استفاده از آزمون t

تیمار/مقادیر	تکرار اول (%)	تکرار دوم (%)	P value	n (تعداد ماهی)
تیمار یک گرلین	۵۵/۵±۱	۵۶±۰/۵	۰/۳۳۳	۴
تیمار هیپوفیز	۵۷±۱/۱	۵۷/۳±۰/۳	۰/۲۵۷	۴

جدول ۳-۲۱ مقایسه میانگین درصد بازماندگی لارو تیمارها در دو تکرار با استفاده از آزمون t

تیمار/مقادیر	تکرار اول (%)	تکرار دوم (%)	P value	n (تعداد ماهی)
تیمار یک گرلین	۵۱±۰/۸	۵۲±۱	۰/۰۹۹	۴
تیمار هیپوفیز	۵۰±۰/۵	۵۱±۱/۱	۰/۱۱۴	۴

مقایسات نشان می دهد میان دو تکرار در متغیرهای همآوری، درصد لقاح، درصد تفریخ و بازماندگی لارو تفاوت معنی داری وجود ندارد ($P < 0.05$).



فصل چهارم

بحث و نتیجه گیری



در تحقیق حاضر فرض شده است که گرلین مانند عصاره غده هیپوفیز میزان هورمون GTH-II را در پلاسمای خون ماهی بالا برده و سبب القاء رسیدگی جنسی می شود که در بافت تخمدان قابل بررسی است و نتیجه تزریق گرلین، تخم ریزی ماهی می باشد و مراحل پس از تخم ریزی تا مرحله لاروی قابل بررسی می باشد.

با این فرضیات اهداف تحقیق حاضر، معرفی یک ماده جدید به جای هورمونهای هیپوفیزی در تکثیر مصنوعی ماهی بنی *Barbus sharpeyi*، بررسی تأثیر خونی (هورمون GTH-II) و بافتی (تخمدان) گرلین در ماهی ماده بنی، بررسی همآوری و درصد باروری، تعداد تخم های هچ شده و لاروهای بازمانده می باشد.

شواهد بدست آمده قویا نشان می دهد که گرلین در اووسیت ها در مراحل فولیکولار، لوتئال، در سلولهای پوششی سطحی و بافت پیوندی تخمدان در پستانداران و غیر پستانداران چون ماهی بیان می شود و این مشاهدات نشان می دهد که سلولهای فوق اهداف بالقوه برای عملکرد عمومی یا موضعی گرلین هستند و گرلین مستقیما روی آنها اثر دارد.

روند رسیدگی جنسی بطور کلی تحت تأثیر هورمون های اصلی محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد کنترل شده و ترشح هورمونهای مربوطه به این محور باعث می گردد تا این روند فیزیولوژیک فعال شود. همانطور که در بسیاری منابع ذکر شده است، شروع روند اصلی این محور با ترشح هورمون آزاد کننده گنادوتروپین (GRH) از هیپوتالاموس مغز آغاز می شود که با تأثیر سلولهای گنادوتروپینی موجود در هیپوفیز بسته به مرحله تولید مثلی، باعث ترشح هورمونهای گنادوتروپینی (GTHs) شده و با عملکرد و تأثیر هورمونهای هیپوفیز بر گنادها و لایه های فولیکولی آن، هورمونهای جنسی که مهمترین آنها ۱۷ بتا- استرادیول است، مراحل تولید مثلی پیش برده می شود تا این فرایند مهم فیزیولوژیک کامل شود.

تأثیر هر یک از این سطوح می تواند در نهایت بر عملکرد تولید مثل و نتیجه آن مؤثر باشد که این تأثیر بستگی به این دارد که این عوامل محرک هستند و باعث تسریع روند تکامل گنادی و پیش برد فرایند تولید مثل تا تخم ریزی می شوند؛ و یا بازدارنده بوده و مانع از تکامل سلولهای جنسی و در نتیجه کاهش و یا حتی توقف این فرایند فیزیولوژیک می گردند.

به همین منظور گرلین که تا چند سال اخیر به عنوان یک پپتید اشتها آور در جانوران شناخته می شد، در تحقیق حاضر اثرات تحریکی آن بر عملکرد تولید مثل ماهی بنی در سه بخش هورمونی، بافتی و بازماندگی تخم و لارو مورد مطالعه قرار گرفته و با تیمارهای کنترل (شم فیزیولوژیک) و هیپوفیز (به عنوان شاهد مثبت) مقایسه شده است سپس با استفاده از نتایج بدست آمده اقدام به نتیجه گیری شده است.

۴-۱ تأثیر هورمون گرلین بر سطح سرمی GTH-II

بررسی نتایج هورمون GTH-II در تیمارهای مختلف نشان می دهد هورمون گرلین می تواند افزایش معنی داری بر میزان هورمون موردنظر داشته باشد. تحقیقات انجام شده در ماهی طلایی نشان می

دهند که گرلین انسانی تزریق شده به طور مستقیم روی گونادوتروپ ها اثر کرده و سبب تحریک ترشح GTH-II می شود (Unniappan et al., 2004).

بررسی ها نشان داده اند که در سلولهای اصلی ارگانهای تولیدمثلی نر و ماده چندین گونه ماهی، پرند و پستاندار، گرلین در فعالیت های تولیدمثلی نقش دارد (Dupont et al., 2007).

البته تزریق درون رگی گرلین در بزهای ماده نژاد سانن سبب کاهش در میانگین غلظت LH پلاسما در طی دوره تزریق می شود ولی تأثیری روی غلظت پلاسمایی FSH در این حیوانات نداشته است (فریفته، ۱۳۸۵)، و تزریق درون بطن مغزی این هورمون در موش صحرایی سبب کاهش فرکانس پالس LH می شود (Futura et al., 2001)، اما یک مطالعه در موش صحرایی نشان داد که گرلین ترشح هر دو هورمون را در محیط *In vitro* تحریک می کند (Fernandez et al., 2004). علی رغم نتایج متناقض در پستانداران، مطالعات اخیر نشان می دهد گرلین در موش صحرایی بلوغ جنسی را به تأخیر می اندازد (Dupont et al., 2007).

در حقیقت گرلین سبب تحریک ترشح GTH-II در ماهی طلایی و اخیراً کپور شده است و در محیط *In vivo* سبب مهار ترشح GTH-II در پستانداران می شود. اگر چه مکانیسم ویژه و نقش این فعالسازی به طور کامل شناسایی نشده است (Unniappan et al., 2005, Dupont et al., 2007)، اما برخی مطالعات فرض می کنند ورود خارج سلولی یون کلسیم از کانالهای دریچه دار نوع L کلسیم و متعاقب آن تحریک بیان mRNA هورمون GTH-II، می تواند یکی از مکانیسم های فعالسازی این هورمون باشد (Yaron et al., 2003). در ضمن مطالعات اخیر نشان می دهد که سایر دستگاههای پیام بر ثانویه که جدیداً مشخص شده اند، در رها سازی GTH-II دخالت دارند. خصوصاً مشارکت عوامل مبادله کننده یون سدیم / یون هیدروژن و همچنین تأثیر مستقیم جریان یون سدیم بر روی رها سازی GTH-II در ماهی طلایی نشان داده شده است (ستاری، ۱۳۸۵).

نتایج فوق نشانگر اثر متضاد گرلین و بعضاً متناقض آن بر هورمون LH پستانداران در مقایسه با ماهیان است که در پستانداران و چند گونه ماهی ثابت شده است.

۴-۱-۱ بررسی دوزهای گرلین مورد استفاده برای تیمار نمونه ها

اگرچه افزایش هورمون GTH-II در هر دو دوز ۱۰۰ و ۱۵۰ نانوگرم بر گرم وزن بدن هورمون گرلین دیده می شود، اما میزان هورمون در دو تیمار گرلین با یکدیگر تفاوت معنی داری ندارند. لذا استفاده بیشتر از هورمون به میزان ذکر شده قادر به ایجاد اثر بالاتر بر محور هورمونی هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد نیست. مشابه این نتایج در تحقیق Unniappan در سال ۲۰۰۴ بر روی خون ماهی طلایی بدست آمده است. البته در این تحقیق از دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ نانوگرم بر گرم وزن بدن استفاده شد و فقط در دوز ۱۰۰ نانوگرم اثرات هورمونی مثبت بدست آمد. میزان هورمون در واقع به میزان رسیدگی مولدین ماده، سن آنها، اندازه، حساسیت و عوامل متعدد دیگر بستگی دارد و در مناطق گرمسیری باید دقت نمود که ماهی دچار ضایعات هورمونی ناشی از بالا بودن دوز تزریق نگردند (هوروات، ۱۳۸۱). نتایج نشان داد دوز ۱۵۰ نانوگرم گرلین در ماهی بنی تأثیر مثبت معنی داری ایجاد نمی کند و طبق یافته های قبلی در فیزیولوژی استرس جانوران، بسیار محتمل است ماهی

های تزریق شده با این مقدار گرلین اصطلاحاً overdose شده باشند، در چنین حالتی سیستم فیزیولوژیک جانور بهم ریخته و ماهی وارد فاز سوم استرس می شود. در این موقعیت ماهی خطر تلف شدن داشته و تمام تلاش جانور فقط برای زنده ماندن است (Van der Kraak, 1997).

در مطالعه حاضر سعی شد که دوز بالاتر گرلین (۱۵۰ نانوگرم) که در ماهیان آزمایش نشده است، مطالعه شود که نتایج همانطور که گفته شد نشانگر بی اثر بودن دوز بالاتر گرلین است و با توجه به اینکه هورمون گرلین سنتتیک همچنان از قیمت جهانی بالایی برخوردار است، لذا برای تحریک مصنوعی محور هورمونی ذکر شده در فوق، همان دوز ۱۰۰ نانوگرم بر گرم وزن بدن و اندکی بالاتر از آن توصیه می شود که در چند مطالعه محدود بر ماهی، اثرات مثبت آن بدست آمده است.

۴-۱-۲ مقایسه اثر گرلین و هیپوفیز بر سطح سرمی GTH-II

مقایسه سطح هورمون GTH-II در تیمار هیپوفیز و گرلین تفاوت معنی داری نشان نمی دهد. لذا از نظر سطح سرمی هورمون GTH-II اثر مثبت هیپوفیز و گرلین به یک اندازه است. رسیدن تخمک ها و تخم ریزی القاء شده، برای کوتاه کردن مسیر اووژنز بطور طبیعی می باشد (فریدپاک، ۱۳۸۷). با توجه به اینکه هیپوفیز در تکثیر مصنوعی ماهیان برای افزایش هورمون موردنظر و در نتیجه آن افزایش رسیدگی جنسی استفاده می شود، لذا گرلین به همان اندازه دارای نقش مثبت است و می تواند در امر تلقیح مصنوعی و القاء رسیدگی جنسی مورد استفاده قرار گیرد.

بنابر نتایج فوق گرلین یک تنظیم کننده فیزیولوژیک می باشد که بر روی مغز ماهیان اثر گذاشته و با تحریک مکانیسم های دخیل، سبب آزادسازی هورمون ویتلوژنیک می شود.

۴-۱-۳ مطالعه اثر زمانهای مختلف خونگیری بر میزان GTH-II

بررسی نتایج هورمونی در چهار زمان نمونه برداری، نشان می دهد که سطح سرمی GTH-II در ۳۰ دقیقه پس از تزریق سطح پایینی داشته، به تدریج در اثر تزریق دوز نهایی هورمون گرلین و عصاره غده هیپوفیز، افزایش معنی داری می یابد و در زمان ۹۰ دقیقه پس از تزریق به بالاترین میزان خود می رسد، در زمان ۱۲۰ دقیقه پس از تزریق همچنان نسبت به میزان اولیه هورمون، بالاست اما واضحا در تمامی تیمارها رو به کاهش می گذارد.

با توجه به نتایج فوق هورمون GTH-II یک نمودار پالسی دارد و این امر اهمیت زمان خونگیری پس از تزریق نهایی را نشان می دهد. افزایش پالسی هورمون GTH-II در تحقیقی در کانادا که Unniappan و همکارانش در سال ۲۰۰۴ بر روی هورمون موردنظر از ۱۵ دقیقه تا ۶۰ دقیقه پس از تزریق در ماهی طلایی انجام دادند، بدست آمده است و هر دو تزریق درون صفاقی و درون بطن مغزی سبب افزایش فرکانس پالس GTH-II می شوند (Unniappan et al., 2004) البته در این تحقیق تا ۶۰ دقیقه پس از تزریق هورمون اندازه گیری شده است و تحقیق حاضر به علت وجود برخی تفاوت های محیطی مانند دمای محیط و تفاوت های گونه ای، اندازه گیری را تا ۱۲۰ دقیقه پس از تزریق انجام داده است و نتایج نشانگر امکان ردیابی هورمون در خون تا ۲ ساعت پس از تزریق است و پس

از ۱۲۰ دقیقه، این هورمون پپتیدی شروع به تجزیه شدن می کند و اثرات آن بر دستگاه تولیدمثلی متوقف می شود.

۲-۴ تأثیر گرلین بر بافت تخمدان

۱-۲-۴ تحلیل مشاهدات ماکروسکوپی

- فاکتورهای وزنی و حجمی تخمدان

نتایج بافتی بدست آمده نشان می دهد از دیدگاه ماکروسکوپی تیمارهای گرلین و هیپوفیز تأثیر معنی داری بر فاکتورهای وزنی (وزن تخمدان و شاخص گنادوسوماتیک) و حجمی نداشته اند و البته پس ۲۴ ساعت انتظار نمی رود وزن یا حجم تخمدان تغییری نماید زیرا این فاکتورها در طی چند ماه، در یک ماهی در حال رشد در اثر تغذیه و سایر فاکتورهای محیطی مناسب، تغییر افزایشی نشان می دهند (Redding et al., 2002).

وزن گناد با افزایش وزن ماهی ها در هر یک از گروهها افزایش می یابد، لذا وزن گناد و شاخص GSI رابطه مستقیمی با وزن کل دارد و این نتیجه توسط بسیاری از محققین که در زمینه ویژگیهای بیولوژیکی رشد و تولیدمثل ماهیان بررسی انجام داده اند، بدست آمده است. به عنوان مثال Stoner و همکاران در ۱۹۹۹ در ماهی Flounder و Chellappa و همکارانش در سال ۲۰۰۲ در ماهی Cichlid این نتیجه را بدست آوردند.

- شکل و رنگ تخمدان

اشکال تخمدان در کلیه تیمارها، بادامی شکل و سبز رنگ بوده و تا دو سوم حفره شکمی را پر می کند (Patino et al., 2002). منشأ غدد جنسی مزودرم جنینی است و در ارتباط نزدیک به دستگاه دفعی نمو می کند (کیو بون، ۱۳۸۴). در خلال فصل تخمیزی، تخمدان ها ساختارهایی بزرگ و به رنگ سبز-زرد هستند و ظاهر آنها دانه دار است که ممکن است حدود ۳۰٪ وزن بدن را به خور اختصاص دهند (ستاری، ۱۳۸۵). سطح مقطع تخمدانهای رسیده کروی است (Thiry et al., 2005). از لحاظ میزان رسیدگی جنسی در مرحله IV رسیدگی قرار دارند در این مرحله غدد تناسلی، به بیشترین رشد خود رسیده و کاملاً رسیده اند (ستاری، ۱۳۸۵). تخمدان ها خیلی بزرگ بوده و با فشار آوردن به شکم ماهی، مقداری از آنها از منفذ تناسلی به صورت توده تخمک های به هم چسبیده خارج می گردد. با توجه به اینکه ماهی های صید شده مولد محسوب می شوند از لحاظ تولیدمثلی لازم است در این مرحله باشند تا تلقیح هورمونی در آنها مؤثر بوده و موفق به تخم ریزی پس از حدود ۲۴ ساعت شوند. این مرحله بدون تزریق مصنوعی هورمون، طولانی بوده و ممکن است تخمدان گاهی چندین ماه بدون هیچگونه تغییری در حالت خواب یا سکون باقی بماند (فریدپاک، ۱۳۸۷).

- مراحل اوژنز

در برش میکروسکوپی تمام مقاطع از تیمارهای پنجگانه مراحل مختلف رشد اووسیت مشاهده می شود، لذا تخمدان ماهی بنی از نوع تخمدان ناهمزمان (Asynchronous) است. این نتیجه در تمام ماهیان متعلق به خانواده کپورماهیان (Cyprinidae) وجود دارد و در آزمایشاتی که پورمهدی بروجنی در سال ۱۳۷۹ و سلامات در سال ۱۳۸۷ در ماهی کپور معمولی و خلیلی در سال ۱۳۸۷ در ماهی شیربت از باربوس ماهیان بومی خوزستان انجام دادند، بدست آمده و تخمدان این ماهیان نیز ناهمزمان گزارش شده است.

بر اساس مشاهدات و تصاویر میکروسکوپی، اوژنز در ماهی بنی در ۶ مرحله انجام می شود؛ این نتیجه نخستین بار توسط فرحمند در سال ۱۳۷۲ در ماهی کپور معمولی گزارش شد و در همان سال نظری شش مرحله رشد اووسیت را در تخمدان کپور نقره ای با توضیح ویژگیهای بافتی مشخص نمود؛ این مراحل در هر پنج تیمار در تحقیق حاضر قابل تشخیص و تمایز است:

در ابتدای رشد اووسیت تعداد هستک کم بوده (شکل ۳-۴) و به دنبال رشد تعداد آنها در قسمت محیطی هسته افزایش می یابد (شکل ۳-۵). این امر بیانگر فعالیت هسته در پروتئین سازی زرده می باشد (Donald, 2007) سیتوپلاسم در مرحله کروماتین نوکلئولوس، کمی بازوفیلیک است اما با افزایش تعداد شبکه اندوپلاسمی لازم برای سنتز پروتئین های زرده به شدت بازوفیلیک می شود (شکلهای ۳-۴ و ۳-۵)، در این مراحل فولیکولها در پاسخ به رنگامیزی روتین H&E عمدتاً رنگ بازوفیلی هماتوکسیلین را نشان می دهند و آبی می شوند (سلامات، ۱۳۸۷). در این مرحله از تکامل اووسیت ساختمان سلولی پایه، از قبیل افزایش رشد هسته و ظهور هستک های مترکم و ارگانهای داخل سلولی، مانند کورتیکول آلئول، که در زمان لقاح نقش مهمی را بازی می کند، می یابد (Nagahama et al., 1994).

سیتوپلاسم اووسیت به تدریج به دلیل تجمع مواد زرده ای خاصیت اسیدوفیلی می یابد تا در مراحل دوم و سوم زرده سازی (مراحل V و VI) کاملاً اسیدوفیل می شود (شکلهای ۳-۱۰ و ۳-۱۲)، در این مراحل فولیکولها در رنگ آمیزی عمومی H&E رنگ اسیدوفیلی ائوزین را نشان می دهند و در پاسخ به رنگ آمیزی اختصاصی PAS که برای مشخص شدن کربوهیدراتها مورد استفاده قرار می گیرد، واکنش PAS مثبت ضعیفی را نشان می دهند (شکلهای ۳-۹ و ۳-۱۱ و ۳-۱۳). این مراحل توسط Palmer و همکاران در سال ۱۹۹۴ در ماهی درام و در سال ۲۰۰۳ توسط Pina و همکاران در ماهی *Alosa fallax* و پورمهدی بروجنی در سال ۱۳۷۹ در کپور معمولی گزارش شده است. در این مراحل پروتئین زرده جذب تخمک می شود، این پروتئین مواد غذایی مورد نیاز برای تکامل جنین را فراهم می کند و همان ویتلوزین است.

ویتلوزن حاصل واکنش متقابل هیپوفیز قدامی در مغز، سلول فولیکول، کبد و تخمک می باشد. هیپوفیز قدامی گنادوتروپین ها را تولید می کنند و به جریان خون رها می کنند. گنادوتروپین ها مستقیماً باعث تحریک سلول های تک و گرانولوزا برای تولید استروژن می شوند. این استروژن به خون رها شده و

باعث تحریک کبد برای تولید ویتلوژنین می شود (Nagahama et al., 1994). رشد توده ای اووسیت در ماهیان تخم گذار مانند بنی به دلیل جذب گلیکوفسفولیپوپروتئین زرده پیش ساز ویتلوژنین (vtg) است. vtg در سلول های کبدی در پاسخ به ۱۷-بتا- استرادیول ساخته می شود و سپس به صورت پس ترجمه ای تغییر می یابد. هنگامی که vtg از سلول های کبدی به داخل گردش خون آزاد می شود، از میان لایه های فولیکولی احاطه کننده اووسیت (سلول های گرانولوزا) عبور می کند و به گیرنده های vtg (با میل ترکیبی زیاد) اتصال می یابد و از طریق آندوسیتوز (بیگانه خواری با واسطه گیرنده ها) از جریان خون خارج می شود (Mussavi et al., 2009). مطالعات متعدد نشان داده است که توانایی اووسیت ها برای خارج کردن vtg از جریان، با رشد اووسیت تغییر می کند و به طور قابل ملاحظه ای قطر اووسیت با افزایش قطر فولیکول ها افزایش می یابد (Luckenbach et al., 2008). این تغییرات رشد ممکن است با افزایش تراکم گیرنده های vtg، افزایش تبدیل گیرنده ها و یا دسترسی بیشتر vtg به گیرنده های خود در ارتباط باشد (ستاری، ۱۳۸۵).

در ماهیان استخوانی سه نوع مواد زرده ای (قطرات چربی، وزیکول های زرده و گلبول های زرده) وجود دارد که در فرآیند ویتلوژنز به ترتیب ظهور می یابند (فریدپاک، ۱۳۸۷). ترتیب ظهور این مواد در اووسیت، بسته به گونه ماهیان استخوانی با یکدیگر متفاوت است، به طوریکه در برخی گونه ها ابتدا وزیکول های زرده ای و بلافاصله بعد قطرات چربی تشکیل می شوند، اما در گونه ای دیگر ابتدا قطرات چربی و بعد وزیکول های زرده ای ظاهر می شوند (Redding et al., 2002). بررسی نتایج رنگامیزی روتین H&E و رنگامیزی اختصاصی PAS، در سیتوپلاسم اووسیت ماهی بنی مانند ماهی درام و کپور معمولی ابتدا وزیکول های چربی و سپس گرانول های زرده ای ظاهر می شوند (سلامات، ۱۳۸۷ و پورمهدی بروجنی ۱۳۷۹). در این رنگامیزی ها وزیکول های چربی سفید رنگ هستند و در مرحله III اووژنز ظاهر می شوند اما وزیکول های زرده ای که گلیکوپروتئین هستند، در رنگامیزی H&E قرمز اسیدوفیلی و در رنگامیزی PAS قرمز کربوهیدراتی می شوند و واکنش PAS ضعیفی نشان می دهند، گرانول های زرده ای در مرحله IV اووژنز ظاهر می شوند (سلامات، ۱۳۸۷).

- کیسول تخمدانی

بررسی های میکروسکوپی با بزرگنمایی بالاتر نشان می دهند اطراف کیسول تخمدان چند لایه بافت چربی وجود دارد و در بین آنها گلبول های قرمز (RBC) دیده می شود که علی رغم گویچه های قرمز پستانداران که فاقد هسته اند، این سلول ها هسته دارند (ستاری، ۱۳۸۵). در تمام مقاطع از کلیه تیمارها دیده می شود که تیغه های تخمک را به داخل بافت تخمدان نفوذ می کنند و همراه با آنها فولیکول های مراحل اول و دوم رشد وارد تخمدان می شود. در ماهی بنی همانند سایر کپور ماهیان، تخمدان توسط لایه احشایی صفاق پوشیده شده و در زیر آن لایه ظریف سفید پرده از جنس بافت همبند سست قرار می گیرد (Thiry et al., 2005). تیغه های تخمک را که از بافت همبند، عروق خونی و اپیتلیوم زایگر تشکیل شده به داخل تخمدان نفوذ می کند. تولید تخمک یا اووژنز در این تیغه ها صورت می گیرد (Takashi et al., 1994).

در واقع دیواره تخمدان در ماهیان استخوانی به دو لایه داخلی و خارجی تقسیم می شود؛ که لایه خارجی را *Tunica albuginea* و لایه داخلی را اپیتلیوم زاینده یا *Germinal epithelium* می نامند. لایه خارجی حاوی بافت های پیوندی مانند بافت چربی، بافت خونی و فیبرهای ماهیچه ای صاف می باشد. کانالهای خونی در کناره های دیواره وجود دارند. لایه داخلی نیز شامل دو لایه است که در مراحل مختلف تکاملی تخمک نقش دارد (Redding et al., 2002). همچنین دیده شده است که فولیکولهای تخمدانی توسط لایه ای از *Zona Radiata* و لایه *Granulosa* احاطه شده است (شکلای ۱۴-۳ و ۱۵-۳). سلولهای فولیکول سوماتیکی (گرانولوزا) منشأ مزانشیمی یا اپیتلیومی دارد (Redding, et al., 2002). لایه گرانولوزا همراه لایه سلولی دیگری به نام تک به عنوان دو لایه سلولی اطراف اووسیتها است که در مرحله پیش ویتلوزن تشکیل می شوند و محل تولید هورمون های استروئید جنسی مانند استروژن و پروژسترون و نیز ساخت مولکول های فعال دیگری نظیر فاکتورهای رشد، پروستاگلاندین ها و سیتوکین ها می باشند (Van der Kraak, et al., 1997). در این مرحله لایه غیر سلولی زونا رادیاتا بین سلول های گرانولوزا و اووسیت هر فولیکول تخمدانی تشکیل می شود (Nagahama, et al., 1994).

- فولیکولهای تخمدانی

در تحقیق حاضر، علیرغم اینکه تخمدان ناهمزمان است و فولیکولهای مراحل مختلف رشد جنسی در کلیه مقاطع میکروسکوپی دیده می شود اما درصد فولیکولهای هر یک از مراحل در تیمارهای شم، گرلین و هیپوفیز با یکدیگر متفاوت است و لذا نیاز است شمارش و درصد گیری فولیکولهای نابالغ و بالغ برای تعیین میزان اثر هورمونها انجام شود.

درصد فولیکولهای بالغ در تیمار یک و دو گرلین و تیمار هیپوفیز نسبت به تیمارهای شم صفر و ۲۴ ساعته افزایش معنی دار و در مقابل درصد فولیکولهای نابالغ کاهش معنی داری یافته است لذا هر دو نوع تیمار گرلین و هیپوفیز بر روی بلوغ بافتی تأثیر مثبت داشته است و سبب افزایش تعداد درصد فولیکولهای بالغ شده است.

با توجه به نتایج بخش هورمونی تحقیق حاضر تیمارهای گرلین و هیپوفیز سبب افزایش میزان سرمی هورمون GTH-II می شوند، نتایج بخش بافتی نیز نشان می دهند این دو تیمار رسیدگی جنسی را افزایش می دهند. این شواهد و نتایج بیانگر اثر مثبت گرلین و هیپوفیز بر محور هورمونی هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد (HPG) است. از آنجایی که میان نتایج تیمارهای گرلین و هیپوفیز تفاوت معنی داری بدست نیامد لذا گرلین و هیپوفیز هر دو به یک اندازه سبب افزایش هورمون GTH-II شده و زرده سازی اووسیت را افزایش می دهند.

تاکنون مطالعه ای بر اثرات گرلین بر بافت تخمدان ماهی در سرتاسر دنیا انجام نشده است اما نتایج حاصل از اثرات این هورمون در سایر مهره داران پستاندار مانند موش صحرایی و غیر پستاندار مانند پرندگان قویا نشان می دهد که گرلین و گیرنده آن GHS-R1a در تخمدان انسان، موش صحرایی، خوک، گوسفند و مرغ وجود دارد و نتیجه تحقیق حاضر تأیید حضور گیرنده گرلین در تخمدان ماهیان است. البته کاربرد *In vivo* گرلین در موش صحرایی فولیکوژنز را تحت تأثیر قرار می دهد و تعداد

سلولهای لوتئالی را کاهش می دهد (Dupont et al., 2007) که این مورد با نتیجه تحقیق حاضر در ماهیان تفاوت دارد. نتایج متضاد بافتی میان پستانداران و ماهیان می تواند بعلت اثر متضاد گرلین بر هورمون GTH-II باشد (Unniappan et al. 2004) زیرا که این هورمون مستقیماً بر رسیدگی جنسی فولیکولهای تخمدانی اثر می گذارد.

- قطر فولیکول

فولیکول در هر یک از مراحل اووژنز قطر مشخصی داشته که به تدریج در کلیه تیمارهای تحت مطالعه، با پیشرفت مراحل اووژنز افزایش قطر می یابد. بزرگ شدن فولیکول بعلت تجمع تدریجی زرده در اووسیت می باشد (Trant et al., 1989).

مقایسات آماری نشان می دهد قطر فولیکول در مراحل سه گانه زرده سازی در تیمار یک و دو گرلین کاهش معنی داری نسبت به تیمارهای شم صفر و ۲۴ ساعته دارد در سایر مراحل اووژنز و سایر تیمارهای مورد مقایسه کاهش معنی دار نمی باشد. لذا گرلین موجب افزایش تعداد فولیکولهای بالغ می شود اما موجب کاهش قطر و اندازه فولیکول می شود. در واقع با افزایش تعداد فولیکولهای بالغ که درشت هستند، در فضای ثابت تخمدان تعداد فولیکولهای کمتری جا می گیرد. رابطه کاهش قطر فولیکول نسبت به افزایش تعداد آنها، توسط Luckenbach و همکارانش در سال ۲۰۰۸ بر ماهی Salmon گزارش شد. در آزمایشی که در محیط *In vitro*، اثر گرلین بر تخمدان جوندگان بررسی شده است، نشان داده شده است که گرلین از قطر فولیکولها و قطر لایه های تکا و گرانولوزا می کاهد (Dupont et al., 2007). تاکنون تحقیقی که اثر گرلین را بر قطر فولیکول در ماهی گزارش کند انجام نشده است.

۴-۳ بررسی اثرات بر همآوری تخمدان، لقاح، تفریح و بازماندگی لاروها

- تخم کشی

در مرحله تخم کشی از مولدین تیمار شده فقط تیمار ۱۰۰ نانوگرم بر گرم وزن بدن گرلین و تیمار هیپوفیز موفق به تخم دهی شدند و تیمار ۱۵۰ نانوگرم گرلین موفق به تخم کشی نشدند. با توجه به اینکه افزایش هورمون GTH-II در هر دو تیمار گرلین دیده شده است لذا عدم موفقیت تخم کشی، به مراحل پس از عملکرد این هورمون مربوط می شود. یک احتمال که در تحقیقاتی بر روی موش تأیید شده است گرسنه ماندن ماهی در طول ۲۴ ساعت است که سبب تحریک سیستم عصبی مرکزی جانور شده و گرلین سیستمیک افزایش می یابد (Fujino et al., 2003) زیرا ترشح گرلین به صورت پالسی است و در هنگام سیری غلظت آن کاهش و هنگام گرسنگی غلظت آن افزایش می یابد (Horvath et al., 2002) و می تواند بر میزان هورمون GTH-II یا هورمونهای استروئیدی تخمدان اثر منفی و کاهشی داشته باشد که در سال ۲۰۰۷ Dupont و همکارانش گزارش نمودند در موش صحرایی گرسنه تستوسترون پلازما به طور معنی داری کاهش می یابد. لذا سطوح بالای گرلین می تواند سبب تغییر در محور تولیدمثلی شده و این امر وابسته به میزان انرژی در دسترس است (Wang et al., 2002).

- همآوری

متداول ترین معیار تعیین پتانسیل (توان بالقوه) تولید مثل در ماهیان همآوری است که اندازه گیری آن نسبتاً ساده است (ستاری، ۱۳۸۵). به طور کلی در ماهی های آب شیرین و گونه هایی که از تخم مراقبت می کنند همآوری پایین است و مقایسه درون گونه ای نشان داده اند که همآوری و اندازه تخم رابطه معکوس دارند و تخم های بزرگ برای نمو وقت بیشتری می برند تا تخم های کوچک و تخم های بزرگ لارو بزرگ تری در زمان تفریح به وجود می آورد. در ضمن همآوری با سن و اندازه ماده افزایش می یابد. تخم های رها شده توسط ماهی، توسط پوشش نسبتاً محکمی به نام کوریون محافظت می شوند. در درون این پوشش، سیتوپلاسم و زرده در درون غشای سلولی محصور هستند. غالباً یک یا چند قطره روغن وجود دارد. تخم های ماهیان استخوانی کروی است و اغلب پر زرده (Telolecithal) است و زرده در قطب گیاهی و سیتوپلاسم در قطب حیوانی متمرکز است که در تخم قطبیت ایجاد می کند (کیو بون، ۱۳۸۴).

نتایج نشان می دهد درصد همآوری تیمار گرلین حدود نصف تیمار هیپوفیز می باشد لذا تیمار گرلین تعداد کمتری تخم رها نموده است که این امر می تواند به همان دلیل گرسنه ماندن ماهی و اثر منفی بر روند رها سازی تخمک ها به علت افزایش بیش از حد گرلین سیستمیک ماهیان مورد تیمار باشد. این بررسی توسط Dupont و همکارانش در سال ۲۰۰۷ بر روی موش صحرایی انجام شد و دو گروه موش صحرایی تغذیه شده و موش های گرسنه با هورمون گرلین تیمار شدند؛ نتیجه نشان داد در موش های گرسنه، گرلین اثرات کاهشی بر استروئیدهای جنسی دارد در حالیکه در جانوران تغذیه شده اثر گرلین مثبت بدست آمده است (Dupont et al., 2007). یک احتمال دیگر این نتیجه می تواند کاهش پروستاگلاندین های دخیل در امر تخریزی باشد؛ اثر کاهشی گرلین بر پروستاگلاندین خرگوش در سال ۲۰۰۷ توسط Dupont و همکارانش گزارش شده است. اما اثر گرلین بر روی همآوری ماهی تاکنون بررسی نشده است.

- لقاح

باروری (لقاح)، با همآوری متفاوت است زیرا به جای تعداد تخمک ها، تعداد واقعی نوزادانی را که تولید شده اند، نشان می دهد. از آنجا که از نقطه نظر توفیق در امر تولید مثل، تعداد نوزادان تولید شده است که واقعا اهمیت دارد و به حساب می آید، بنابراین، باروری باید معیار بهتری نسبت به همآوری باشد (ستاری، ۱۳۸۵).

لقاح با عبور اسپرم از درون یک روزنه قیفی شکل در تخمک به نام میکروپیل صورت می گیرد که منجر به ترکیب پیش هسته اسپرم و تخمک می شود. غشای سلولی از کوریون جدا شده و فضای پیرا زرده ای را ایجاد می کند و روزنه بسته می شود و از ورود اسپرم بیشتر جلوگیری می کند. اگر اسپرم وجود نداشته باشد، لقاح پذیری تخمک به زودی از دست می رود. پس از لقاح کوریون سخت می شود و از تخم محافظت می کند. کوریون نسبت به آب و مولکولهای کوچک نفوذ پذیر باقی می ماند، ولی جایگاه تنظیم اسمزی غشای سلولی است (کیو بون، ۱۳۸۴).

پس از انجام تلقیح مصنوعی تخمک های استحصالی باید آنها را در شرایط کارگاهی انکوبه نمود در طول مدت انکوباسیون نیاز اکسیژنی تخم ها مهم است که به تدریج با پیشرفت مراحل جنینی افزایش می یابد در ضمن درجه حرارت آب و عدم آلودگی آب نیز اهمیت دارد (Huet, 1970). در شرایط کارگاهی بعلت کمبود اکسیژن در برخی قسمت های انکوباتور که تعویض آب در آن ضعیف است و یا درجه حرارت نامناسب، برخی تخم ها در همان مراحل اولیه انکوباسیون تلف خواهند شد و این تخم ها به عنوان تخم های ناسالم تلقی می شوند (Bardach et al., 1972). لذا پس از ۲۴ ساعت درصد لقاح اندازه گیری می شود. مقایسه آماری درصد لقاح در دو گروهی که موفق به تخم کشتی شدند، بیانگر موفقیت بیشتر تخم های حاصل از مولدین تیمار شده با گرلین دارد، لذا اگر چه مولدین با گرلین تخم کمتری را می کنند اما همان تعداد تخم ها در مقایسه با مولدین با هیپوفیز شانس بیشتری برای لقاح دارند.

تفریخ

تخم های لقاح یافته همراه با تقسیم سلولها، فرایند تسهیم و ریخت زایی را طی می کند و لایه ها و سپس اندام ها را به وجود می آورد. در ماهیان استخوانی تسهیم از نوع ناقص (Meroblastic) است. در اینجا تسهیم در قطب حیوانی موجب تشکیل بلاستودرم یا کلاهکی از سلولها می شود. بلاستودرم روی زرده رشد می کند که روخزیدگی (Epiboly) نامیده می شود و نهایتاً آن را محصور می کند تا گاسترولا، کره تو خالی از سلول ها که زرده را در بر گرفته و با سوراخ کوچکی (بلاستوپور) با فضای پیرا زرده ای در ارتباط است را به وجود آورد. محور جنینی در ارتباط با لب پشتی بلاستوپور قرار می گیرد و مرحله نورو لا با سر، نخاع و ماهیچه های آینده بدن به زودی قابل مشاهده می گردند. پس از مدتی، قسمت دم رشد می کند و از نورو لا بیرون می زند و به صورت دایره ای در درون فضای پیرا زرده ای پیچ می خورد. کلاهک بینایی (چشم های آینده) و قلب اولین اندام هایی هستند که به راحتی قابل شناسایی هستند. کاملاً قبل از تفریخ رویان غالباً در درون کوریون می چرخد. پیش از آمد تفریخ، نرم شدن کوریون در نتیجه اثر آنزیم های ترشح شده از غدد واقع بر سر است (کیو بون، ۱۳۸۴).

مقایسه آماری درصد تفریخ تخم ها در دو گروه افزایش معنی دار میزان هچ در گروه هیپوفیز را نسبت به گروه گرلین نشان می دهد. با توجه به اینکه شرایط کارگاهی مانند اکسیژن و درجه حرارت آب در هر دو گروه مورد بررسی یکسان بوده است بنابراین موفقیت بیشتر تخم های مولدین گروه گرلین در لقاح، به دلیل برتریهای بیولوژیک تخمک های استحصالی نسبت به گروه هیپوفیز بوده و موفقیت بالاتر تخم های گروه هیپوفیز در تفریخ شدن نسبت به گروه گرلین به علت مناسب تر و سالم تر بودن تخم های بارور شده در گروه هیپوفیز می باشد. در کپور ماهیان لارو تفریخ شده پس از ۳ یا ۴ روز در آب با دمای ۲۴ درجه سانتیگراد، قادر به شنا کردن می باشد که نشانه پایان تفریخ است و قادر به هضم و جذب غذای خارجی است (فریدپاک، ۱۳۸۱).

بازماندگی لارو

مواد کوریونی در زمان تفریخ به عنوان مواد غذایی توسط رویان مصرف می شوند و سپس رویان از کوریون آزاد می شود تا تبدیل به لارو شود (کیو بون، ۱۳۸۴). با پر شدن کیسه شنا، نوزاد ماهی تبدیل به بچه ماهی می شود که قادر به تغذیه خارجی است (فرید پاک، ۱۳۸۱). مقایسه لارو ماهیان در دو گروه نشان می دهد درصد بازماندگی لاروها تفاوت معنی داری ندارند، لذا لاروهای تفریخ شده در هر دو گروه به یک میزان قابلیت تبدیل به بچه ماهی نورس را دارند.

لازم به ذکر است که در زمینه اثر گرلین بر لقاح و مراحل نمو جنینی و لاروی ماهیان و سایر مهره داران تا کنون تحقیقی صورت نگرفته و گزارشی در این مورد برای ثبت در تحلیل نتایج بدست آمده وجود ندارد.

۴-۴ بررسی دو تکرار تیمارها

به منظور تأیید نتایج آزمایشات، تکرار دوم از سه بخش آزمایشات در تیمارهای مورد مطالعه انجام شد. مقایسه آماره ها و تحلیل آنها توسط آزمون های مرتبط نشان داد که تفاوت معنی داری میان نتایج هورمونی، بافتی و بازماندگی تخم و لارو در دو تکرار وجود ندارد ($P > 0.05$).

۴-۵ نتیجه گیری

در این مطالعه اثر دو دوز هورمون گرلین بر سطح خونی GTH-II و میزان رسیدگی جنسی تخمدان و وقایع پس از تخم ریزی مانند همآوری و باروری و تفریح و در نهایت بقای لاروها بررسی شد و به منظور مقایسه بهتر و کاربردی نتایج حاصله، همین بررسی ها در ماهیان تیمار شده با دوز روتین عصاره غده هیپوفیز انجام شد و ماهی های تیمار شده با گرلین و هیپوفیز با یکدیگر و با ماهی های تیمارهای شم که فقط سرم فیزیولوژی دریافت نمودند، مقایسه و نتایج آنها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در واقع هیپوفیز در این مطالعه به عنوان شاهد مثبت مورد استفاده قرار گرفت. بر این مبنا هورمون گرلین قادر است سبب افزایش میزان سرمی GTH-II شود و لذا می تواند همانند هیپوفیز به عنوان هورمون القاء رسیدگی جنسی بکار رود.

مطالعات بافتی نشان داد که گرلین و هیپوفیز فاکتورهای وزنی و حجمی را تغییر نمی دهند. اما درصد فولیکولهای بالغ نشان می دهد که میزان رسیدگی جنسی بافت تخمدان پس از تیمار با گرلین و هیپوفیز در طول ۲۴ ساعت پس از تزریق، افزایش می یابد، لذا هورمون گرلین علاوه بر تأثیر مثبت بر عملکرد دستگاه تولیدمثلی، قادر است اثر مثبت بر تخمدان القاء نموده و رسیدگی جنسی را بالا ببرد.

در ادامه بررسی های بافتی، نتایج حاصل از میکرومتری مقاطع نشان می دهند که قطر فولیکول در ۳ مرحله اول اووژنز در تمام گروههای تحت آزمون تغییری نمی کند اما در ۳ مرحله دوم که زرده سازی اووسیت انجام می شود، قطر اووسیت در تیمار گرلین کاهش می یابد.

ماهیان تیمار شده طبق دستورالعمل تکثیر مصنوعی ماهی بنی، پس از ۲۴ ساعت برای تخم کشی مورد بررسی قرار گرفتند و فقط ماهیان تیمار شده با دوز پایین تر گرلین و هیپوفیز موفق به تخم کشی پس از ۲۴ ساعت شدند.

همآوری تخم ها در گروه هیپوفیز بالاتر، درصد لقاح در گروه گرلین بیشتر، درصد تفریح تخم ها در گروه هیپوفیز بالاتر اما درصد بازماندگی دو گروه تفاوتی ندارد.

در نتیجه داده های هورمونی، مشاهدات میکروسکوپی و نتایج هیستومتری، گرلین هورمونی است که به طور غیر مستقیم بر روی محور HPG اثر گذاشته و باعث تحریک آدنو هیپوفیز و ترشح هورمون GTH-II می شود لذا این هورمون در بلوغ و رسیدگی نهایی اووسیت در تخمدان نقش دارد و سبب افزایش ویتلوژنز و تعداد فولیکولهای بالغ می شود. در اثر افزایش تعداد فولیکولهای بالغ در فضای ثابت تخمدان از قطر متوسط آنها کاسته می شود.

با توجه به این نتایج هورمون پیتیدی گرلین بر فرآیند رسیدگی جنسی اثر القائی مثبت داشته و مقایسه میان هیپوفیز و گرلین نشان می دهد اثرات هورمونی و بافتی گرلین به اندازه هیپوفیز مثبت است و توصیه می شود در مطالعات آینده دوزهای دیگری از آن در تکثیر مصنوعی ماهی بنی مورد توجه قرار گیرد با این هدف که بتواند در آینده مشکل غیر فعال شدن تخمدان ماهی بنی ماده، که از مشکلات مرکز تکثیر ماهیان بومی منطقه مورد مطالعه در این تحقیق است، برطرف نماید

۶-۶ پیشنهادات

با توجه به اینکه تحقیقات انجام شده در زمینه اثرات گرلین بر گونه های مختلف ماهیان بسیار کم است چنانکه در مقالات مربوط به اثرات گرلین، این کمبود اطلاعات و نیاز به ارائه نتایج در سایر گونه ها اعلام شده است، در ضمن ماهی بنی از آن گروه گونه هایی است که کمتر مدل آزمایشات و تحقیقات مختلف قرار گرفته است؛ لذا بر اساس تحقیق انجام شده در این بررسی پیشنهادهای زیر به صورت موردی ارائه می شود:

اثر گرلین بر هورمون GTH-II در سایر گونه های مهم آبهای داخلی و دریایی ایران بررسی شود.

اثر گرلین بر هورمونهای استروئیدی جنس های نر و ماده (آندروژنها، استروژن و پروژسترون) گونه های مهم ماهیان ارزیابی شود.

دوزهای دیگری از گرلین که بین دو دوز مورد استفاده در این تحقیق می باشد (زیر ۱۰۰ و ۱۱۰ و ۱۲۰ نانوگرم) استفاده شود و میزان اثرات آنها مورد بررسی قرار گیرد.

اثرات گرلین در فاصله ovulation و spawning ماهی بررسی شود به این منظور که علت همآوری پایین مولدین گرلین بدست آید.

اثرات گرلین بر بافت تخمدان گونه های پرورشی از لحاظ اثر بر رسیدگی جنسی آنها بررسی شود.

اثرات گرلین بر بافت بیضه ماهیان از لحاظ تأثیر بر روند اسپرماتوژنز و اسپرمیوژنز مطالعه شود.

اثرات گرلین بر سایر بافتها مانند مغز، هیپوفیز، معده، استخوان و لنف بررسی شود.

سایر هورمونهای سنتتیک بر روند تکثیر مصنوعی ماهی بنی از نظر خونی و بافتی بررسی شوند، با این هدف که ماده ای بهتر از هیپوفیز با اثرات قویتر، برای تکثیر مصنوعی ماهی بنی بدست آید.



منابع



- ۱- افشین نیا، ف. ۱۳۷۸. تحلیل کاربردی داده ها: راهنمای استفاده از نرم افزار SPSS. مدیریت مطالعات و توسعه آموزش پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان. ۷۴-۹۰ و ۱۱۵-۱۰۹.
- ۲- پورمهدی بروجنی، م. ۱۳۷۹. بررسی برخی فاکتورهای بیولوژیک و هیستولوژیک گندهای کپور معمولی در طی دو فصل پرورش. پایان نامه جهت اخذ دکتری حرفه ای دامپزشکی از دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز. ۹،-۲۲.
- ۳- حبیبی، ط، راعی، م. ۱۳۶۹. جانور شناسی عمومی مهره داران. جلد چهارم. مؤسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. ۱۰۹،-۳۹.
- ۴- حمیدیان، غ، آلبوغبیش، ن. ۱۳۸۱. مطالعه ساختار بافت شناسی و هیستومتریک پوست نواحی مختلف ماهی بنی. پایان نامه دکتری حرفه ای دامپزشکی. دانشگاه شهید چمران اهواز. ۱،-۸.
- ۵- خلیلی، ل، درست قول، م، پیغان، ر، پاپهن شوشتری، ف. ۱۳۸۷. مطالعه ماکروسکوپی و میکروسکوپی تخمدان ماهی شیربت طی سیکل تولید مثلی سالیانه. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشکده علوم. دانشگاه شهید چمران. ۵،-۳۰.
- ۶- دوبلر، ش، فرانسوا، ای. ۱۳۷۶. جانور شناسی مهره داران. ترجمه جمشید درویش. انتشارات محقق. ۵۷،-۵۵.
- ۷- ستاری، م. ۱۳۸۱. ماهی شناسی ۱ تشریح و فیزیولوژی. انتشارات نقش مهر. ۴۴۰،-۵۲۰.
- ۸- سلامات، ن، آلبوغبیش، ن، هاشمی تبار، م. ۱۳۸۷. مطالعه ساختار بافتی غده هیپوفیز، کشت سلولی و ارزیابی فعالیت ترشحی گنادوتروپینی آن از طریق تعیین تأثیر این ترشحات بر روی پاسخ های استروئیدی تخمدان در ماهی کپور معمولی. پایان نامه دکتری تخصصی بافت شناسی دانشکده دامپزشکی. دانشگاه شهید چمران. ۶،-۴۰.
- ۹- شکری بوسجین، م. ۱۳۷۴. روشهای بررسی بیولوژیک غدد جنسی ماهیان، پروژه مرکز تحقیقات شیلات خوزستان. ۱۲،-۲۲.
- ۱۰- شهیدی، ط، پیغان، ر. ۱۳۷۹. مقایسه برخی خصوصیات آناتومیک و مورفومتریک ماهی بنی و ماهی کپور علفخوار. اولین کنگره علوم پایه دامپزشکی ایران. دانشگاه شهید چمران اهواز. ۵،-۳۰.
- ۱۱- کد، ب، عبدلی، ا. ۱۳۷۵. تنوع زیستی ماهیان آب شیرین ایران. ماهنامه آبیان: سال هفتم. شماره ۱. ۴،-۱۱.
- ۱۲- کیو، ب، مارشال، ان، بلاکستر، جی. ۱۳۸۴. زیست شناسی ماهی ها. ترجمه یزدان کیوانی. انتشارات دانشگاه صنعتی اصفهان. ۱۸۹،-۲۱۰.
- ۱۳- فرحمند، ح. ۱۳۷۲. ایجاد تغییر جنسیت در ماهی کپور معمولی به وسیله هورمون ۱۷-آلفا متیل تستوسترون. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس. ۴۱،-۵۵.
- ۱۴- فرید پاک، ف. ۱۳۸۵. دستورالعمل اجرایی تکثیر مصنوعی و پرورش ماهی های گرم آبی. انتشارات علمی آبیان. ۶۰،-۱۵۰.
- ۱۵- فریفته، ف، خزعلی، ه، امامی، م. ۱۳۸۵. اثر تزریق درون رگی گرلین روی میانگین غلظت پلاسمایی هورمون لوتئینی LH در بزهای ماده نژاد سannen. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه شهید بهشتی. ۱-۲۰.
- ۱۶- علیجانی، ر، خزعلی، ه، امامی، م. ۱۳۸۵. اثر تزریق وریدی گرلین بر غلظت پلاسمایی هورمونهای T₃ و T₄، وزن و تولید شیر در بزهای سannen در سطوح مختلف انرژی. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه شهید بهشتی. ۱،-۲۰.
- ۱۷- مشتاقی، ک، دارابی امین، م. ۱۳۸۷. ساختمان و عملکرد بیولوژیک گرلین. پایان نامه کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی. دانشگاه علوم پزشکی کرمان. ۱-۲۰.

- ۱۸- محمد نظری، ر. ۱۳۷۲. بررسی سیکل تکامل تخمدان ماهی کپور نقره ای. پایان نامه کارشناسی ارشد. گروه شیلات و محیط زیست دانشگاه تهران. ۵۶،-۷۵
- ۱۹- نجف پور، ن.، المختار، م.، نیک پی، م.، اسکندری، غ.، میاحی، ی.، شکیبیا، غ. ۱۳۷۵. گزارش نهایی پروژه شناسایی برخی از ماهیان آب شیرین خوزستان. مؤسسه تحقیقات شیلات ایران. ۱،-۹۶
- ۲۰- نوری، ا. شهرپور ۱۳۸۹. بررسی فیزیولوژیک اثر دوره نوری در تکامل تخمک ماهی قزل آلا رنگین کمان *Onchorhynchus mykiss*. پایان نامه دکتری تخصصی شیلات. دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران. ۱۰۰،-۱۲۰
- ۲۱- نیک بخت، م.، آلبوغبیش، ن. ۱۳۸۶. مطالعه میکروسکوپی بافت لنفوئیدی ضمیمه لوله گوارش ماهی بنی (*Barbus sharpeyi*) در دو فصل گرم و سرد. پایان نامه جهت اخذ دکتری تخصصی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز. ۶-۹
- ۲۲- وثوقی، غ.، مستجیر، ب. ۱۳۸۱. ماهیان آب شیرین. مؤسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. ۸۰-۶۵،
- ۲۳- ولی نژاد، ا.، حقوقی راد، ن.، پاپهن، ف. ۱۳۷۳. تعیین انواع و فراوانی انگل های مونوژن در ماهیان شیربت و بنی رودخانه کارون. پایان نامه دکتری دانشگاه شهید چمران اهواز. ۱،-۲۰
- ۲۴- هوروات، ل.، تاماش، گ.، کریس، س. ۱۳۸۱. تکثیر و پرورش ماهیان گرمابی. ترجمه کریم مهدی نژاد و حسین خارا. مؤسسه تحقیقات شیلات ایران. ۲۵،-۶۰
- 25- Ahmed, S., Harvey, S. 2002. Ghrelin: a novel hypothalamic GH-releasing factor in domestic fowl (*Gallus domesticus*). J. Endocrinol: 172. 117-125.
- 26- Ando, H., Swanson, P., Urano, A. 2003. Regulation of LH synthesis and release by GnRH and gonadal steroids in masu salmon. Fish Physiology and Biochemistry: 28. 61-63.
- 27-Asakawa, A., Inui, A., Kaga, T., Yuzuriha, H., Nagata, T., Ueno, N., Makino, S., Fujiyama, M., Nijima, A., Fujino, M. A., Kasuga, M. 2001. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance with motilin. Gastroenterology: 120. 337-345.
- 28- Bapary, M. A. J., Fainuuleli, P. 2009. Environmental control of gonadal development in the tropical damselfish *Chrysiptera cyanea*. Marin Biology Research: 5 (5). 462-469.
- 29- Bardachj, E., Ryther, J. H., Larney, W. O. 1972. Aquaculture. John Willey and sons Publ. N.Y.
- 30-Beato, M., Sanchez-Pacheco, A. 1996. Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. Endocrine Reviews: 17. 587-609.
- 31-Bieniars, K., Epler, P., Thuy, L. N., Kogut, E. 1997. Changes in the ovaries of adult carp. Aquaculture Journal: 17. 45-68.
- 32- Bjerregaard, L. B., Lindholst, C., Korsgaard, B., Bjerregaard, P. 2008. Sex hormone concentrations and gonad histology in brown trout (*Salmo trutta*) exposed to 17 β -estradiol and bisphenol A. Ecotoxicology: 17 (4). 252-263.
- 33-Broglio, F., Gttero, C., Arvat, E., Ghigo, E. 2003. Endocrine and non-endocrine actions of ghrelin. Hormone Research: 59. 109-117.

- 34-Canosa., Fabian, L., Unniappan, S., Peter, R. E. 2005. Pre-prandial changes in growth hormone release in goldfish: role of somatostatin ghrelin and gastrin-releasing peptide. *Amj physiol Regul Integr Comp Physiol*: 289. R125-R133.
- 35- Celand, E., Peng, C. 2009. Endocrine / Paracrine control of Zebrafish ovarian development. *Molecular and Cellular Endocrinology*: 312. 42-52.
- 36- Cerda, J., Subherdar, N., Reich, G., Wallace, R. A., Selman, K. 1998. Oocyte sensitivity to serotonergic regulation during the follicular cycle of the teleost *Fundulus heteroclitus*. *Biology of Reproduction*: 59. 53-61.
- 37- Coad, B. W., 2002. The freshwater fishes of Iran. The Academy of Science of Czech Republic. Bran: 5-69.
- 38- Cummings, D. E., Shanon, M. H. 2003. Roles for ghrelin in the regulation of appetite and body weight. *Arch. Surg*: 138. 389-396.
- 39- Dickey, J. T., Swanson, P. 2000. The cell: A molecular Approach, 2nd ed. ASM Press. Washington D.C. 31-33.
- 40-Donald, B. M. 2007. Fish Histology (Female reproductive system). Netherlands Springer. ISBN: 978-1-4020-5715-1 (e-book).
- 41- Dupont, J., Maillard, V., Coyral, S., Ramé, C., Froment, P. 2010. Ghrelin in female and male reproduction. *International Journal of Peptides*: 1-8.
- 42- Fernandez, F., Tena-Sempere, M., Navarro, V. M., Barreiro, M. L., Castelano, J. M., Aguilar, E., Pinilla, L. 2005. Effects of ghrelin upon gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin secretion in adult female rats: in vivo and in vitro studies. *Neuroendocrinology*: 82. 245-255.
- 43- Fraser, E. J., Bosma, P. T., Trudeau, V. L., Docherty, K. 2002. The effect of water temperature on the GABAergic and reproductive systems in female and male goldfish (*Carassius auratus*). *General and Comparative Endocrinology*: 125. 163-175.
- 44- Fujino, K., Inue, A., Asakawa, A. 2003. Ghrelin induces fasted motor activity of the gastrointestinal tract in conscious fed rats. *J Physiol*: 550 (Pt 1). 227-40.
- 45- Furuta, M., Funabashi, T., Kimura, F. 2001. Intracerebroventricular administration of ghrelin rapidly suppresses pulsatile luteinizing hormone secretion in ovariectomized rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun*: 288. 780–785.
- 46-Gaytan, F., Barreiro, ML., Caminos JE. 2004. Expression of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in normal human testis and testicular tumors. *J Clin Endocrinol Metab*: 89. 400-409.
- 47- Gelinas, D., Callard, G. V. 1997. Immunolocalization of aromatase and androgen receptor-positive neurons in the goldfish brain. *General and Comparative Endocrinology*: 106. 155-168.
- 48- Glasser, F., Mikolajczyk, B., Jalabert, J., Baroiller, F., Berton, B. 2004. Temperature effects along the reproductive axis during spawning induction of

grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). General and Comparative Endocrinology: 136. 171-179.

49- Grey, C. L., Chang, J. P. 2008. Ghrelin-induced growth hormone and gonadotropin releases from goldfish pituitary cells utilize both calcium entry and the PKC pathway. Sixth International Symposium on Fish Endocrinology. Calgary Canada. June 22–27. 55.

50- Gualillo, O., Caminos, J., Blanco, M., Garcia-Caballero, T., Kojima, M., Kangawa, K., Dieguez C., Casanueva F. 2001. Ghrelin, a novel placental-derived hormone. Endocrinology: 142. 788–794.

51- Gur, G., Melamed, P., Gissis, A., Yaron, Z. 2000a. The pituitary-gonadal axis during maturation of the black carp (*Mylopharyngodon piceus*). Journal of Experimental Zoology: 286. 405-413.

52- Harrera, M., Fernandez-Delgado, C. 2006. The life history patterns of *Barbus bocagei* selateriin a tributary stream of the Guadalquivir River basin fish. Ecology of fresh water. Volume1: 42-51.

53-Hattori, N., Saito, T., Yagyu, T., Jiang, B.H., Kitagawa, K., Inagaki, C. 2001. GH, GH receptor, GH secretagogue receptor and ghrelin expression in human T cella, B cells, and neutrophils. J. Clin Endocrinol Metab: 86. 4284-4291.

54- Horvath, T. L., Diano, S., Sotonyi, P. 2001. Minireview: ghrelin and regulation of energy balance—a hypothalamic perspective. Endocrinology: 142(10). 4156-4163.

55- Howes, G. J., Winfield, I. J., Nelson, J. S. 1991. Systemic and biogeography : an overview., Cyprinid Fishes, Systematic. Biology and Exploitation. 1-33.

56- Huet, M. 1970. Text book of fish culture, breeding and cultration of fish. Fishing News (Books) Ltd., Surrey.

57-Iqbal, J., Kurose, Y., Canny, B., Clarke, I.J. 2006. Effects of central infusion of ghrelin on food intake and plasma levels of growth hormone, luteinizing hormone, prolactin, and cortizol secretion in sheep. Endocrinology: 147. 510–519.

58- Kagawa, H., Young, G., Nagahama, Z. 1982. Estradiol-17 β production in amago salmon follicle: role of theca and granulose cells. General and comparative Endocrinology: 47. 440-448.

59- Kaiya, H., Miyazato, M., Kangawa, K., Peter, R. E., Unniappan, S. 2008. Ghrelin: a multifunctional hormone in non-mammalian vertebrates. Comp. Biochem. Physiol: A 149. 108–128.

60- Kandel-Kfir, M., Gur, G., Melamed, P., Zillberstein, Y., Cohen, Y., Zmora, N., Kobayashi, M., Elizur, A., Yaron, Z. 2002. Gonadotropin response to GnRH during sexual ontogeny in the common carp (*Cyprinus carpio*). Comparative Biochemistry and Physiology: 132. 17-26.

- 61- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Matsuo, H., Nakazato, M., Kangawa, K. 1999. Ghrelin is a growth hormone-releasing acylated peptide from the stomach. *Nature*: 402. 656–660.
- 62- Kokokiris, L., Mourot, B., Le Menn, F., Kentouri, M., Fostier, A. 2000. Endocrine changes during the annual reproductive cycle of the red porgy (*pagrus pagrus*). *Fish Physiology and Biochemistry*: 23. 1-11.
- 63-Kotunia, A., Labielski, R. 2006. Ghrelin in the postnatal development of the gastrointestinal tract. *Journal of physiology and pharmacology*: 57Supp5. 97-111
- 64- Le, D. Y., Liu, D., Wong, A., Xiong, F., How, C. L. 1996. Steroidogenic factor I and estradiol receptor act in synergism to regulate the expression of the salmon gonadotropin II β subunit gene. *Molecular Endocrinology*: 10. 217- 229.
- 65- Li, M. D., Ford, J. J. 1998. A comprehensive evolutionary analysis based on nucleotide and amino acid sequences of the α - and β -subunits of glycoprotein hormone gene family. *Journal of Endocrinology*: 156. 529-542.
- 66- Luckenbach, J. A., Kusakabe, M., Swanson, P., Young, G. 2008. Unilateral ovariectomy increases egg size and reduces follicular atresia in the semelparous coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Journal of Experimental Zoology*: 309A. 468-476.
- 67- Martini, A. C., Fernandez-Fernandez, R., Tovar, S., Navarro, V. M.,Vigo, E., Vazquez, M. J., davies, J. S., Thompson, N. M., Aguilar, E., Pinilla, L., Wells, T., Dieguez, C., Tena-Sempere, M. 2006. Comparative analysis of the effects of ghrelin and unacylated ghrelin on luteinizing hormone secretion in male rats. *Endocrinology*: 147. 2374–2382.
- 68- Mathews, S., Khan, I. A., Thomas, P. 2002. Effects of maturation-inducind steroid (MIH) on LH secretion and the GnRH system at different stages of the gonadal cycle in Atlantic croaker. *General and Comparative Endocrinology*: 126(3). 287-297.
- 69- Mishra, A., Joy, K. P. 2006. Effects of gonadotropin in vivo and 2-hydroxyoestradiol-17 β in vitro on follicular steroid hormone profile associated with oocyte maturation in the catfish. *Heteropneustes fossils*: 186. 341-353.
- 70- Monbrison, D. E., Tzchori, I., Holland, M. C., Zohar, Y., Yaron, Z., Elizur, A. 1997. Acceleration of gonadal development and spawning induction in the Mediterranean grey mullet. *Mugil cephalus*: Preliminary studies, *Israeli Journal of Aquaculture/Bamidge*: 49. 214-221.
- 71- Mussavi, M., Nelson, E. R., Habibi, H. R. 2009. Seasonal regulation of vitellogenin by growth hormone in the goldfish liver. *General and Comparative Endocrinology*: 161. 79-82.
- 72-Mustafa, A., Al Mukhtar, S., Al Noor, J. H. S. 2006. General reproduction Biology of Bunni (*Barbus sharpie* Gurter, 1874) in Al Huwaizah Marsh, Basra-Iraq. *Turkish Journal of fisheries and Aquatic Sciences*: 6. 149-153.

- 73- Nagahama, Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *International Journal of Developmental Biology*: 38. 217-229.
- 74- Nagaya, N., Kojima, M., Uematsu, M., Yamagishi, M., Hosoda, H., Oya, H., Hayashi, Y. Kangawa, K. 2001. Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. *Am. J. Physiol., Regul. Integr. Comp. Physiol*: 280. R1483–R1487.
- 75- Nagaya, N., Umatsu, M., Kojima, M. 2001. Elevated circulating level of ghrelin in cachexia associated with chronic heart failure: relationships between ghrelin and anabolic/catabolic factors. *Circulation*: 101(17). 2034-2038.
- 76 –Nicholas, A., Tritas, E. Kokkotou, G. 2006. The physiology and potential clinical application of ghrelin a novel peptide hormone. *Mayo Clin Proc*: 81(5). 653-660.
- 77- Ohta, H., Tanaka, H. 1997. Relationship between serum levels of human chronic gonadotropin (hCG) and 11-ketotestosterone after a single injection of hCG and induced maturity in the male Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*: 153. 123-134.
- 78- Okumura, H., Nagaya, N., Enomoto, M., Nakagawa, E., Oya, H., Kangawa, K. 2002. Vasodilatory effect of ghrelin, an endogenous peptide from the stomach. *J Cardiovasc Pharmacol*: 39. 779-783.
- 79- Palmer, E. E., Sorensen, P. W., Adelman, I. R. 1995. A histological study of seasonal ovarian development in freshwater drum in the Red Lakes Minnesota. *Journal of Fish Biology*: 47. 199-210.
- 80- Pati, D., Balshaw, K., Grinwich, D. L., Hollenberg, M. D., Habibi, H. R. 1996. Epidermal growth factor receptor binding and biological activity in the ovary of goldfish, *Carassius auratus*. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*: 270. R1065-R1072.
- 81- Patino, R., Sullivan, C. V. 2002. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. *Fish Physiology and Biochemistry*: 26. 57-70.
- 82- Pina, T., Esteves, E., Andrade, J. P. 2003. Gross and histological observations of ovarian development in twaite shad, *Alosa fallax fallax*, from the Rivers Mira and Guadiana (Portugal). *Scientia Marina*: 67 (3). 313-322.
- 83- Planas, J. V., Athos, J., Swanson, P. 2000. Regulation of ovarian steroid genesis in vitro by FSH and LH during sexual maturation in salmonid fish. *Biology of reproduction*: 62. 1262-1269.
- 84- Redding, J. M., Patino, R. 2002. Reproductive System. In: Ostander, G. K. (Ed.), *The laboratory Fish*. Academic Press, New York. 261-266, 489-499.
- 85- Riley, L. G., Fox, B. K., Kaiya, H., Hirano, T., Grau, E. G. 2005. Long-term treatment of ghrelin stimulates feeding, fat deposition, and alters GH/IGF-I axis in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*: 142. 234–240.

- 86- Saligaut, C., Linard, B., Breton, B., Anglad, I., Bailhacher, T., Kah, O., Jegou, P. 1999. Brain aminergic systems in salmonids and other teleost in relation to steroid feedback and gonadotropin release. *Aquaculture*: 177. 13-20.
- 87- Sarasquete, C., Munoz-Cueto, J. A., Gonzalez De Canales, M. L., Garcia-Garcia, A., Rodriguez-Gomez, F. J., Pinuela, C., Rendon, C., Rodriguez, R. B. 1997. Histochemical and immocytochemical study of gonadotropic pituitary cells of the killifish (*Fundulus heteroclitus*) during annual reproductive cycle. *Scientia Marina*: 61. 436-449.
- 88- Sokolowska-Mikolajczyk, M., Socha, M., Szczerbik, P., Epler, P. 2009. The effects of ghrelin on the in vitro spontaneous and sGnRH-A stimulated luteinizing hormone (LH) release from the pituitary cells of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Comp. Biochem. Physiol.*: A 131. 417-424.
- 89- Stoskopf, M. K. 1993. *Fish Medicine*. W. B., Saunders Company, Philadelphia. 9-11, 449-450.
- 90- Strussmann, C. A., Nakamura, M. 2002. Morphology, endocrinology and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiology and Biochemistry*: 26 (1). 13-29.
- 91- Swanson, P., Scott, A. P., Sumpter, J. P., Kime, D. E., Rolfe, M. S. 1991. Salmon gonadotropin: Reconciling old and new ideas. *Proceedings of the Fourth International Symposium on the reproductive Physiology of fish*, Norwich, UK. 2-7.
- 92- Takasi, F., Hibiya, T. 1994. *An Atlas of fish histology: Normal and pathological features*. 2nd ed., Collage of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University, Tokyo. 104-108, 112-116.
- 93- Takaya, K., Ariyasu, H., Kanamoto, N., Iwakura, H., Yoshimoto, A., Harada, M., Mori, M., Komatsu, Y., Usui, T., Shimatsu, A., Ogawa, Y., Hosoda, K., Akamizu, T., Kojima, N., Kangawa, K., Nakao, K., 2000. Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*: 85. 4908-4911.
- 94- Tan, N. S., Lam, T. J. Ding, J. L., 1996. The first contiguous estrogen receptor gene from a fish, *Oreochromis aureus*. Evidence for multiple transcripts, *Molecular and Cellular Endocrinology*: 120. 177-192.
- 95- Tannenbaum, GS., Epelbaum, J., Bowers, CY. 2003. Interrelationship between the novel peptide ghrelin and somatostatin/growth hormone-releasing hormone in regulation of pulsatile growth hormone secretion. *Endocrinology*: 144. 967-974.
- 96- Tena, S. 2005. Ghrelin: novel regulator of gonadal function. *J. Endocrinol. Investig.*: 28. 26-29.
97. Thiry, M., Poncin, P. 2005. Morphological changes of the nucleolus during oogenesis in oviparous teleost fish, *Barbus barbus* L. *Journal of structural Biology*: 152. 1-13.

- 98- Trant, J. M., Thomas, P. 1989. Isolation of a novel maturation-inducing steroid produced in vitro by ovaries of Atlantic croaker. *General Comparative Endocrinology*: 75. 397-404.
- 99- Unniappan, S., Canosa, L. F., Peter, R. E. 2004. Orexigenic actions of ghrelin in goldfish: feeding-induced changes in brain and gut mRNA expression and serum levels, and responses to central and peripheral injections. *Neuroendocrinology*: 79. 100–108.
- 100- Unniappan, S., Lin, X., Cervini, L., Rivier, J., Kaiya, H., Kangawa, K., Peter, R. E. 2002. Goldfish ghrelin: molecular characterization of the complementary desoxyribonucleic acid, partial gene structure and evidence for its stimulatory role in food intake. *Endocrinology*: 143. 4143-4146.
- 101- Unniappan, S., Peter, R. E. 2004. In vitro and in vivo effects of ghrelin on luteinizing hormone and growth hormone release in goldfish. *Am. J. physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*: 286. R1093-R1101.
- 102- Unniappan, S., Peter, R. E. 2005. Structure, distribution and physiological function of ghrelin in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology: Part A* 140. 396-408.
- 103- Vacher C., Mananos, E., Breton, B., Marmignon, M. H. Saligaut, C. 2000. Modulation of pituitary gonadotropin receptors and secretion of FSH and LH during the annual reproductive cycle of female rainbow trout. *Neuroendocrinology*: 12. 1-9.
- 104- Van Der Geyten, S., Sanders, J. P., Darras, V. M., Kuhn, E. R., Leonard, J. L. Visser, T. J. 1998. Cloning of tilapia type I and III deiodinases. *Annals of the New York Academy of Sciences*: 839. 498-499.
- 105- Van der Kraak, G., Suzuki, K., Peter, R. E., Itoh, H., Kawauchi, H. 1992. Properties of common carp gonadotropin I and gonadotropin II. *General and Comparative Endocrinology*: 85. 217-229.
- 106- Van der Kraak, G., Chang, J. P. Janz, D. M. 1997. Reproduction. In: Evans, D. H. (ED), *The Physiology of Fishes*. 2nd edition, CRC Press, Boca Raton, Florida. 465- 448.
- 107- Yada, T., Kaiya, H., Moutoh, K., Azuma, T., Hyodo, S., Kangawa. 2006. Ghrelin stimulates phagocytosis and superoxide production in fish leukocytes. *Journal of Endocrinology*: 189: 57-65.
- 108- Wang, Z., Wang, W., Qiu, W., Fan, Y., Zhao, J., Wang, Y. Zheng, Q. 2007. Involvement of Ghrelin-Growth hormone secretagogue receptor system in pathoclinical profiles of digestive system cancer. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*: 39 (12). 992-998.
- 109- Wang, G. L., Lee, H., Englander, E. 2002. Ghrelin-not just another stomach hormone. *Regul. Pept.* 105 (2). 75-81.
- 110- Weil, C., Hansen, P., Hyam, D., Le Gac, F., Breton, B. Crim, L. W. 1986. Use of pituitary cells in primary culture to study the regulation of gonadotropin

hormone (GTH) secretion in rainbow trout: setting up and validating the system as assessed by its responsiveness to mammalian and salmon releasing hormones. *Gen. Comp. Endocrinol.*: 62. 202–209.

111- Wren, A. M., Small, C. J., Fribbens, C. V., Neary, N. M., Ward, H. L., Seal, L. J., Ghatei, M. A. Bloom, S. R. 2002. The hypothalamic mechanisms of the hypophysiotropic action of ghrelin. *Neuroendocrinology*: 76. 316–324.

112- Woynorovich, E., Harrath, L. 1980. The artificial propagation of warmwater fishes. A manual for extension. FAO, Rome.

113- Yaron, Z. 1995. Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. *Aquaculture*: 129. 49-73.

114- Yingzi, L., Kiyoshi, M., Massayo, F., Shuntaro, K., Koji, F., Mitsuo, I. 2004. Ghrelin acts at the nucleus of the solitary tract to decrease arterial pressure in rats. *Hypertension*: 43. 977-982.

115- Zohar, Y. 1996. New approaches for the manipulation of ovulation and spawning in farmed fish. *Bulletin of National Research Institute of Aquaculture*: 2. 43-48.

116- Zohar, Y., Mylonas, C. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture*: 197 (1-4). 99-136.

Histology and hormonal effect of Ghrelin on ovary of Benni (*Barbus sharpeyi*) in order to study sexual maturity, zygote and larval generation

Abstract

Benni (*Barbus sharpeyi*) is valuable fish that Khuzastan fisheries office propagated it artificially in Susangerd Fish Propagation Center every year. Pituitary gland is used for this aim but female fish lost their fertilization power after 2-3 years, so in present research, new hormone, that is called Ghrelin. The aims of this research are histology, hormonal, zygote and larval generation studies and comparing the results with each other.

Ghrelin is a multifunctional peptidyl hormone which increases GTH-II in fish, amphibian, and birds and mammalian so its effect on Benni sexual maturation was studied. Human Ghrelin (hGRL) was obtained from ANASPEC, Canada, with 28 amino acids.

In the present study, three levels of ghrelin including 0 (sham treatments), 0.10 (treatment 1) and 0.15 µg/g (treatment 2) body wt and one level of pituitary gland 4000 µg/g (pituitary treatment) with two replications were used.

56 specimens were injected intraperitoneally and their ghrelin level was evaluated immediately after injection and after 24 h. Control fish (n=16) were just injected by physiological saline. For hormonal studies sham and experimental fish (n=40) were anesthetized with MS-222 at a concentration of 250 mg l⁻¹, and blood samples were collected and kept at 4°C, then spun to collect serum. Serum samples were stored at -20°C until the RIA for CTH-II. For histology studies immediately after injection a piece of ovary was collected from control fish (Sham zero) after being anesthetized. The sampled ovaries were fixed in Buin solution and embedded in paraffin, and stained to Sections of 5–6 µm using haematoxylin and eosin. The ovarian samples were performed with a compound microscope. Histology and micrometry studies had done.

The mature oocytes had given from mature fish, then weighted and the working fecundity were counted. The mature oocytes fertilized, the eggs were incubated and the percentage of fertilization was calculated. After 72h the eggs hatched and the percentage of hatch was counted. The percentage of hindrance was calculated after 6 days.

Hormonal results indicate that ghrelin and pituitary increase significantly the GTH-II level in comparison to sham.

Macroscopic observations (before taking ovary) showed that ovaries with green colored have couple oval structure located in the abdominal cavity. Microscopic studies of dissected ovaries indicated simultaneous growth of

oocytes with 6 stages. The type of the ovary is asynchronous. The results indicated that both of the ghrelin treatment increased the percentage of mature follicles followed by decrease of immature follicles. There were significant differences ($P<0.05$) between the number of mature and immature follicles. Average diameter of follicle in both of the ghrelin treatment was significantly ($P<0.05$) declined in the stages of the vitellogenesis when the result compared to the other treatment.

Just treatment 1 and pituitary treatment can give mature oocytes. The fecundity of pituitary treatment significantly increase in comparison to ghrelin treatment ($P<0.05$). In food-restricted fish where endogenous ghrelin levels are known to be increased, a chronic administration of ghrelin induces overt negative effect in releasing mature oocytes. The percentage of fertilization was significantly increase ($P<0.05$) in ghrelin t. in comparison to pituitary t. and the percentage of hatch was significantly increase ($P<0.05$) in pituitary t. in comparison to ghrelin t. There was no significant difference ($P>0.05$) in terms of percentage of hindrance between treatments.

In conclusion, the present study demonstrated that ghrelin has positive effect on the level of GTH-II, oocyte maturation, ovarian vitellogenesis and the number of mature follicles of *Barbus sharpeyi* ovary. Increasing of the mature follicles number reduces their average diameter, indicating stimulating effect of ghrelin in sexual maturation of *Barbus sharpeyi*. The ghrelin and pituitary treatment have equal chance in the post-stage of spawning.

Keywords: ghrelin; *Barbus sharpeyi*; ovary; sexual maturity

Hadideh Mabudi